



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *TP53*, *VEGFA* E *HIF1 α* EM
PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA, CITOPENIA IDIOPÁTICA
DE SIGNIFICADO INDETERMINADO E CITOPENIAS NÃO NEOPLÁSICAS:
ASSOCIAÇÃO COM CITOCINAS E FATORES DE PROGNÓSTICO**

FORTALEZA

2019

TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *TP53*, *VEGFA* E *HIF1 α* EM PACIENTES
COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA, CITOPENIA IDIOPÁTICA DE SIGNIFICADO
INDETERMINADO E CITOPENIAS NÃO NEOPLÁSICAS: ASSOCIAÇÃO COM
CITOCINAS E FATORES DE PROGNÓSTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Barroso Duarte

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S239e Santos, Talyta.

Estado da expressão dos genes TP53, VEGFA e HIF1 α ; em pacientes com Síndrome Mielodisplásica, Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado e Citopenias Não Neoplásicas: associação com citocinas e fatores de prognóstico. : Estudo da expressão dos genes TP53, VEGFA e HIF1 α ; em pacientes com Síndrome Mielodisplásica, Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado e Citopenias Não Neoplásicas: associação com citocinas e fatores de prognóstico. / Talyta Santos. – 2019.

102 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientação: Prof. Dr. Fernando Barroso Duarte.

1. Síndrome Mielodisplásica. 2. Citopenias. 3. Angiogênese. 4. Inflamação. 5. Proteína supressora de tumor p53. I. Título.

CDD 615

TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS

ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES *TP53*, *VEGFA* E *HIF1 α* EM PACIENTES
COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA, CITOPENIA IDIOPÁTICA DE SIGNIFICADO
INDETERMINADO E CITOPENIAS NÃO NEOPLÁSICAS: ASSOCIAÇÃO COM
CITOCINAS E FATORES DE PROGNÓSTICO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fernando Barroso Duarte
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado
Universidade de Fortaleza (Unifor)

Prof^a. Dr^a. Fernanda Montenegro de Carvalho Araújo
Faculdade Unichristus

Prof^a. Dr^a. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo, os quais deram sentido a esse trabalho e inspiram nossa constante busca por conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Cristo Jesus, por me ter concedido a vida pra que eu pudesse abençoar outros.

Aos meus pais, Raimundo Nonato Feitosa dos Santos e Lúcia Maria de Jesus dos Santos, por abdicarem de seus sonhos e aspirações em favor do meu sucesso. Nenhuma palavra ou atitude será suficiente para expressar, à altura, a gratidão e o sentimento de dívida que levo no peito. Como se diz em nossa família: vocês não existem.

A minha irmã, Priscila de Jesus dos Santos Alves, que, mesmo distante, sei que torce por mim e se preocupa comigo, como uma boa irmã mais velha. Sou grata pelo seu exemplo, desde criança, de pessoa estudiosa e dedicada. Amo você, minha maninha.

Ao meu esposo e grande amigo, Carlos Geovane Silva de Sousa, que me ensinou coisas maravilhosas, que esteve comigo tanto em momentos alegres, como em situações angustiantes. Sou imensamente grata pelo seu incentivo, maturidade e altruísmo.

À família do meus esposo que me acolheu como um de seus membros, especialmente minha sogra, Maria da Conceição Sousa Silva.

À Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes, que para além de uma orientadora, tornou-se uma grande amiga. Caminhando juntas na Hematologia desde 2010, construímos laços fraternos que superaram nossas diferenças e que são adornados pelo respeito, admiração, consideração e sinceridade. Meu muito obrigada pelos conselhos, puxões de orelha e incentivo.

Ao doutor Fernando Barroso Duarte, por despertar em mim o interesse e o encantamento pela Síndrome Mielodisplásica, por me ajudar a compreendê-la, pelos conselhos como coorientador e pelo apoio no desenvolvimento desse estudo, em diversas áreas.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas pelas risadas, debates, críticas e sugestões recebidas. Esse foi um ambiente onde tornei-me um ser humano e uma profissional melhor.

À equipe de coleta de medula do HEMOCE, pela disponibilidade em me ajudar durante o período de coleta de amostras.

Aos colegas e amigos do Laboratório CAC, pelo incentivo, apoio e contribuição para a conclusão desse trabalho.

Aos professores participantes da banca examinadora por aceitarem o convite e por investirem tempo visando o aprimorando do presente estudo.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um conjunto de doenças complexas em que o diagnóstico pode ser desafiador, principalmente em pacientes que não preenchem os critérios para SMD, porém apresentam citopenias inexplicadas. A expressão de genes envolvidos em neoplasias e a presença de substâncias no microambiente medular podem ser relevantes no estudo dessas condições, visto que interagem diretamente com as células saudáveis e neoplásicas da medula. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão dos genes *TP53*, *HIF1- α* e *VEGFA* e os níveis de citocinas VEGFA, IL-6, TNF α e IFN γ em pacientes com SMD, Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado (ICUS), Citopenia Clonal de Significado Indeterminado (CCUS) e Citopenias de Causa não Neoplásica (CNN), associando os resultados a fatores clínicos, laboratoriais e de prognóstico. Inicialmente, foram incluídos 85 pacientes. Destes, 13 foram excluídos após confirmação de outros diagnósticos, ficando um total de 72 participantes, dos quais: SMD (n=34), ICUS (n=31) e CNN (n=7). Amostras de medula foram colhidas em EDTA para extração do material genético e obtenção do plasma. A expressão dos genes de interesse foi realizada através da reação em cadeia da enzima polimerase (PCR) em tempo real, através do sistema *TaqMan*®. A quantificação dos marcadores VEGFA, IL-6, TNF α e IFN γ foi feita por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante. Dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais foram retirados dos prontuários. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa *GraphPadPrism5.0* e *SPSS 24.1*. As comparações entre as médias dos grupos foram realizadas pelos testes t-Student ou Mann-Whitney ou pela análise de variância (ANOVA), dependendo do número de grupos. A curva de sobrevida livre de eventos foi realizada pela curva de Kaplan-Meier, através do programa *Cutt off finder*. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$. A média de idade dos pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN foi respectivamente 74, 61 e 50. Os parâmetros do hemograma foram semelhantes nos três grupos, excetuando-se a contagem de monócitos que foi maior no grupo com SMD ($p < 0,05$). Quanto às citocinas, os níveis de IFN γ foram semelhantes entre os grupos SMD e ICUS/CCUS e diminuídos quando comparados ao grupo CNN ($p = 0,017$). O mesmo foi observado em relação à expressão do gene *HIF1- α* , onde o grupo CNN apresentou maior expressão em relação aos demais ($p = 0,019$). Quando analisados de acordo com as citopenias, a expressão do mRNA *VEGFA* foi maior no grupo com níveis de hemoglobina entre 8-10 g/dL ($p = 0,038$). Em relação às plaquetas, os níveis de TNF α foram superiores naqueles com contagem menor que 50.000/mm³ ($p = 0,01$). Os pacientes com fibrose medular apresentaram níveis maiores de TNF α ($p = 0,031$) e de IL-6 ($p = 0,001$). Ao estratificar os pacientes com SMD em formas iniciais e avançadas da doença, observou-se uma maior concentração de IFN γ ($p = 0,003$) no primeiro grupo. Entretanto, para a citocina TNF α foram obtidas maiores concentrações no grupo em estágio mais avançado ($p = 0,045$). Não foram observadas associações entre a expressão dos genes e as citocinas analisadas e o número de blastos e a citogenética. Os parâmetros avaliados não influenciaram a sobrevida dos pacientes no período do estudo. Os resultados do estudo permitiram concluir que a citocina IFN γ e o gene *HIF1- α* estão mais expressos nas citopenias de origem não clonal; que os níveis de TNF α e IL-6 foram associados à fibrose. Os resultados sugeriram ainda que os genes *HIF1- α* , *VEGFA* e *TP53* atuam através de mecanismos em conjunto, tendo em vista as correlações obtidas. Novos estudos nessa linha de pesquisa serão úteis na elucidação dos mecanismos envolvidos nesses processos dessas diferentes condições.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica; Citopenias; Angiogênese; Inflamação; Proteína Tumoral p53.

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is a complex set of diseases in which the diagnosis can be challenging, especially in patients who do not meet the criteria for MDS, but have unexplained cytopenias. The expression of genes involved in neoplasias and the presence of substances in the medullary microenvironment may be relevant in the study of these conditions, since they interact directly with the healthy and neoplastic cells of the marrow. The aim of the study was to evaluate the expression of the TP53, HIF1- α and VEGFA genes and the cytokine levels VEGFA, IL-6, TNF α and IFN γ in patients with MDS, Idiopathic Cytopenia of Indeterminate Significance (ICUS), Clonal Cytopenia of Undetermined Significance (CCUS) and Non-Neoplastic Cytopenias (CNN), associating the results with clinical, laboratory and prognostic factors. Initially, 85 patients were included. From these, 13 were excluded after confirming other diagnoses, remaining 72 participants: MDS (n = 34), ICUS (n = 31) and CNN (n = 7). Bone marrow samples were collected in EDTA to extract the genetic material and obtain the plasma. Gene expression was performed through the polymerase chain reaction (PCR) in real time, with TaqMan® system. Quantification of VEGFA, IL-6, TNF α and IFN γ was performed by enzyme immunoassay (ELISA), according to the manufacturer's instructions. Epidemiological, clinical and laboratory data were taken from medical records. Statistical analysis was performed using GraphPadPrism5.0 and SPSS 24.1. The comparisons between the means of the groups were performed using Student's t-test or Mann-Whitney test or analysis of variance (ANOVA), depending on the number of groups. The overall survival curve was performed by the Kaplan-Meier curve, through the Cutt off finder program. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The mean age of patients with MDS, ICUS / CCUS and CNN was 74, 61 and 50, respectively. Blood count parameters were similar in the three groups, except for the monocyte count that was higher in the MDS group ($p < 0.05$). As for cytokines, IFN levels were similar between the SMD and ICUS / CCUS groups and decreased when compared to the CNN group ($p = 0.017$). The same was observed in relation to the expression of the HIF1- α gene, where the CNN group presented greater expression in relation to the others ($p = 0.019$). When analyzed according to cytopenias, VEGFA mRNA expression was higher in the group with hemoglobin levels between 8-10 g/dL ($p=0.038$). Regarding platelets, TNF α levels were higher in those with a count below 50,000 / mm³ ($p=0.01$). Patients with medullary fibrosis presented higher levels of TNF α ($p=0.031$) and IL-6 ($p=0.001$). In stratifying patients with MDS in early and advanced forms of the disease, a higher concentration of IFN γ ($p=0.003$) was observed in the first group. However, for the cytokine TNF α , higher concentrations were obtained in the more advanced stage ($p=0.045$). No associations were observed between the expression of the genes and the cytokines analyzed and the number of blasts and cytogenetics. The parameters evaluated did not influence the survival of patients in the study period. The results of the study allowed to conclude that the cytokine IFN γ and the HIF1- α gene are more expressed in cytopenias of nonclonal origin and TNF α and IL-6 levels were associated with fibrosis. The results also suggested that the genes HIF1- α , VEGFA and TP53 act through mechanisms together, in view of the correlations obtained. New studies in this line of research will be useful in elucidating the mechanisms involved in these processes of these different conditions.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome; Cytopenias; Angiogenesis; Inflammation; Tumor Protein 53.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da patogênese da Síndrome Mielodisplásica.....	20
Figura 2	Interpretação das mutações no diagnóstico de pacientes com citopenias inexplicadas.....	24
Figura 3	Representação esquemática da atividade do HIF1- α em condições de normóxia e hipóxia.....	40
Figura 4	Localização do gene <i>VEGF</i> no cromossomo 6.....	42
Figura 5	Fluxograma da distribuição dos pacientes de acordo com critérios de inclusão e exclusão.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Contagem de Monócitos em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	59
Gráfico 2	Expressão do mRNA do gene <i>HIF1-α</i> em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	63
Gráfico 3	Níveis de $IFN\gamma$ em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	63
Gráfico 4	Níveis de $IFN\gamma$ em pacientes com Síndrome Mielodisplásica de acordo como estágio da doença.....	65
Gráfico 5	Níveis de $TNF\alpha$ em pacientes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com as formas da doença.....	66
Gráfico 6	Expressão do mRNA do gene <i>VEGFA</i> de acordo com os níveis de hemoglobina estabelecidos pelo R-IPSS, nos grupos SMD, ICUS/CCUS e SMD.....	68
Gráfico 7	Níveis da citocina plasmática $TNF\alpha$ entre pacientes com SMD, ICUS e CNN de acordo com a contagem de plaquetas estabelecida pelos R-IPSS.....	69
Gráfico 8	Níveis da citocina $TNF\alpha$ de acordo a presença e ausência da mielofibrose....	68
Gráfico 9	Níveis de citocina $TNF\alpha$ de acordo a presença e ausência da mielofibrose, em pacientes nos grupos SMD e ICUS/CCUS.....	71
Gráfico 10	Níveis de citocina IL-6 de acordo a presença e ausência da mielofibrose.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos neoplasmas indolentes segundo OMS 2016.....	23
Tabela 2	Evolução da classificação da Síndrome Mielodisplásica até 2008.....	27
Tabela 3	Classificação da SMD segundo OMS 2016.....	30
Tabela 4	Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) para SMD.....	34
Tabela 5	Classificação de risco e estimativa de sobrevida segundo o Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) para SMD.....	35
Tabela 6	Relação das sondas utilizadas na expressão gênica por qtPCR.....	48
Tabela 7	Análise clínica e laboratorial dos pacientes	52
Tabela 8	Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com SMD de acordo com o estágio da doença.....	55
Tabela 9	Alterações citogenéticas do pacientes com Síndrome Mielodisplásica e pacientes com ICUS/CCUS.....	58
Tabela 10	Matriz de correlação da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>VEGF</i> e <i>HIF1α</i> e as citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGF$ e $IL6$ em paciente com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	60
Tabela 11	Matriz de correlação da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>VEGF</i> e <i>HIF1α</i> e as citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGF$ e $IL6$ em paciente com SMD.....	61
Tabela 12	Análise da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>HIFα</i> , <i>VEGF</i> e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, e $IL-6$ como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	62
Tabela 13	Análise da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>HIF1α</i> e <i>VEGF</i> e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGFA$ e $IL-6$ como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD.....	64
Tabela 14	Influência da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>HIF1α</i> e <i>VEGFA</i> e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGFA$ e $IL-6$ nos níveis hemoglobina estabelecidos pelo R-IPSS.....	67
Tabela 15	Influência da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>HIFα</i> e <i>VEGFA</i> e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGFA$ e $IL-6$ nos níveis de plaquetas estabelecidos pelo R-IPSS.....	68
Tabela 16	Análise da expressão dos genes <i>TP53</i> , <i>HIF1α</i> , <i>VEGFA</i> e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGFA$ e $IL-6$ em relação à mielofibrose.....	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Ang-1	Angiopoetina 1
Ang-2	Angiopoetina 2
ASXL1	Gene additional sex combslike 1
bFGF	Fator de crescimento de fibroblastos básico
BSA	Soro bovino com albumina
CCUS	Citopenia Clonal de Significado Desconhecido
cDNA	Ácido Desoxrrribonucléico complementar
CHIP	Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado
COX2	Ciclo-oxigenase-2
CTH	Células-Tronco Hematopoéticas
DMV	Densidade Microvascular
DNA	Ácido Desoxrrribonucléico
DNMT3	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta gene
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
EPO	Eritropoietina
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EZH2	Gene Enhancerofzestehomolog 2
FAB	Grupo Fracês-Americano-Britânico
GAPDH	Gliceraldeído fosfatodesidrogenase
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
HIF	fatores induzidos por hipóxia
HLA-DR15	Antígeno Leucocitário humano isotipo DR
HRP	Peroxidase da planta <i>horseradish</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICUS	Citopenia Idiopática de Significado Desconhecido
IDUS	Displasia Idiopática de Significado Desconhecido
IFN- γ	Interferon gama
IGF	Fatores de Crescimento Insulina-like
IL	Interleucina
ISCN	Sistema Internacional para a Nomenclatura Citogenética Humana
KRAS	Gene Kirsten rat sarcoma

MO	Medula Óssea
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NF- κ B	factor nuclear kappa B
NRAS	neuroblastoma RAS viral oncogenehomolog
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds-Ratio (Razão de chances)
PBS	Tampão salino de fosfato
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI-3K	Fosfatidil-Inositol-3-quinase
pVHL	Fator de supressão tumoral Von Hippel-Lindau
RIPSS	Sistema Internacional de Escores Prognóstico Revisado
RNA	Ácido ribonucleico
SEERS	Surveillance, Epidemiology and End Results
SF3B1	Gene Splicing Factor 3b Subunit 1
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de Nucleotídio Único
SRSF2	Gene Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2
TET2	Tetmethylcytosinedioxygenase 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
U2AF1	Gene U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do Fator de crescimento endotelial vascular
Δ Cq	Delta Ciclo de Quantificação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Incidência da SMD.....	17
1.2 Senescência e patogenia da SMD.....	18
1.3 Diagnóstico da SMD.....	21
1.4 Citogenética na SMD.....	24
1.5 Classificação e Prognóstico da SMD.....	25
1.6 Tratamento da SMD.....	32
1.7 Estratificação de risco e Prognóstico da SMD.....	33
1.8 Gene TP53 na Mielodisplasia.....	36
1.9 Angiogênese na SMD.....	37
1.10 Fator induzido por hipóxia (HIF).....	39
1.11 Fator de crescimento vascular endotelial – VEGF.....	42
2 OBJETIVOS.....	45
2.1 Objetivo Geral.....	45
2.2 Objetivos específicos.....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Aspectos éticos.....	46
3.2 Local do estudo.....	46
3.3 Casuística.....	46
3.3.1 Critérios de inclusão	47
3.3.2 Critérios de exclusão.....	47
3.4 Coleta de dados	47
3.5 Coleta de amostra biológica.....	47
3.6 Extração do mRNA.....	47
3.7 Síntese do cDNA.....	48
3.8 Reações de qPCR (PCR quantitativa em tempo real).....	48
3.9 Determinação relativa dos níveis de expressão dos genes alvo	48
3.10 Determinação dos níveis plasmáticos de VEGF-A, TNF-α, IL-6 e IFN-γ.....	49
3.11 Análise Estatística.....	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 Análise clínica e laboratorial dos pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	51
4.2 Caracterização da interação dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i> e <i>VEGFA</i> e citocinas imunomoduladoras IFN-γ, TNFα e IL-6 na fisiopatologia de pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN com base em análise de correlação.....	59

4.3	Análise da expressão dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i> e <i>VEGFA</i> e das citocinas <i>IFNγ</i>, <i>TNFα</i>, <i>VEGFA</i> e <i>IL-6</i> como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.....	61
4.3.1	<i>Análise da expressão dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i> e <i>VEGFA</i> e das citocinas <i>IFNγ</i>, <i>TNFα</i> e <i>IL-6</i> como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD.....</i>	64
4.4	Influência da expressão dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i>, <i>VEGFA</i> e das citocinas <i>IFNγ</i>, <i>TNFα</i>, <i>VEGFA</i> e <i>IL-6</i> nas citopenias periféricas.....	67
4.5	Expressão dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i>, <i>VEGFA</i> e das citocinas <i>IFNγ</i>, <i>TNFα</i>, <i>VEGFA</i> e <i>IL-6</i> de acordo com a fibrose.....	70
4.6	Análise da expressão dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i>, <i>VEGFA</i> e das citocinas <i>IFNγ</i>, <i>TNFα</i>, <i>VEGFA</i> e <i>IL-6</i> de acordo com o cariótipo, celularidade da medula óssea e dispoese.....	72
4.7	Análise de sobrevida de acordo com a expressão dos genes <i>TP53</i>, <i>HIF1α</i>, e <i>VEGFA</i> e das citocinas <i>IFNγ</i>, <i>TNFα</i>, <i>VEGFA</i> e <i>IL-6</i>.....	72
5	DISCUSSÃO.....	73
6	CONCLUSÃO.....	81
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
	REFERÊNCIAS	83
	ANEXO A- Parecer de aprovação do Comitê de Ética.....	95
	APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado aos participantes do estudo.....	98
	APÊNDICE B- Artigos produzidos em colaboração relacionados à tese de doutorado.....	99

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) compreende um conjunto de doenças clonais das células progenitoras hematopoéticas, caracterizada por hematopoese displásica e ineficaz, citopenias periféricas e instabilidade clonal, com aumento do risco de transformação para leucemia aguda (DELLA PORTA et al. 2015; GERMING et al. 2008; GREENBERG et al., 2013).

As alterações iniciais ocorrem no microambiente medular e afetam os processos de maturação e diferenciação das células progenitoras, bem como o controle da apoptose, acarretando uma hematopoese ineficaz, situação em que as células da medula não são liberadas em quantidade adequada na circulação. A diminuição das células sanguíneas circulantes, conhecida como citopenias periféricas é, frequentemente, o achado inicial que leva à suspeita da doença (ADÈS et al. 2014).

Os sinais e sintomas clínicos comumente encontrados decorrem das citopenias e são consequência do funcionamento inadequado da linhagem hematológica afetada. Os mais comuns são fadiga, palidez, fraqueza e dispneia, devido à anemia. Além disso, podem ser observados quadros recorrentes de infecções, púrpura e complicações hemorrágicas. Alguns pacientes desenvolvem ainda dependência transfusional (MALCOVATI et al. 2011).

Na maioria dos casos, não é possível atribuir uma causa definida. Sabe-se que alguns fatores podem influenciar o desenvolvimento da doença, como exposição ocupacional a agentes tóxicos, principalmente benzeno e seus derivados, presentes em pesticidas, tintas e outros produtos; senescência do processo de hematopoese, decorrente do aumento da idade, que é o principal fator de risco isolado (BOWEN, 2013; IRONS; KERZIC, 2014). Quando não é desencadeada diretamente por um evento mutagênico exógeno, a SMD é classificada como primária ou *de novo*. Entretanto, também pode ocorrer em consequência ao tratamento com agentes quimioterápicos, como análogos da purina e agentes alquilantes; radioterapia ou ainda, após o transplante de medula óssea, sendo classificada como SMD secundária. As SMDs secundárias geralmente apresentam um curso mais agressivo, alterações citogenéticas complexas, menor sobrevida e correspondem a 10% a 15% de todos os casos (DELLA PORTA et al. 2015).

1.1 Incidência da SMD

A SMD é uma patologia complexa, pois apresenta componentes tanto genéticos e epigenéticos como imunológicos e, apesar de grandes avanços no conhecimento de cada um desses fatores, como a descoberta de mais de 40 genes associados à SMD nos últimos anos, alguns mecanismos fisiopatológicos ainda não foram elucidados e muito desse conhecimento ainda não foi traduzido para o paciente como uma alternativa terapêutica curativa de fato (CAZZOLA; DELLA PORTA; MALCOVATI, 2013).

O aumento da expectativa de vida em todo o mundo implicou em maior incidência das doenças associadas à senescência. A SMD é a neoplasia mais comum em idosos. Entretanto, é possível haver uma subnotificação devido a diversos fatores, como avaliação incompleta em pacientes idosos que apresentam citopenias leves, falta de inclusão nos registros populacionais e a resistência de alguns profissionais em coletar medula óssea de idosos, por ser um exame invasivo (BELLI et al. 2015; COGLE, 2015).

A incidência anual da SMD nos Estados Unidos, onde existe o maior número de estudos epidemiológicos é de 3,4 casos para cada 100.000 habitantes, representando mais de 10.000 novos diagnósticos e cerca de 60.000 indivíduos portadores da doença. Em pacientes com idade a partir de 80 anos, esse valor aumenta mais de dez vezes, chegando a 59,8 por 100.000 habitantes (SEKERES, 2010).

Segundo dados do SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*), analisados a partir de um levantamento, a taxa de incidência global é de 4,9 casos por 100.000 habitantes (COGLE, 2015). As estimativas são de que esse número aumente, tendo em vista projeções de duplicação da população com idade superior a 65 anos até 2030 (SEKERES, 2010). É uma doença rara em crianças e adolescentes, com uma incidência de 0,1/100.000 habitantes em pessoas com < 40 anos.

No Brasil, tem crescido a atenção dada às doenças com maior incidência nos idosos, devido ao aumento da expectativa de vida do brasileiro como apontam os dados do último censo, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010). Porém, ainda são escassos os dados epidemiológicos sobre SMD. Um dos primeiros trabalhos epidemiológicos no país foi realizado por Magalhães et al. (2010) que avaliaram 476 pacientes com diagnóstico entre 2003 e 2007 tratados em 12 centros brasileiros. Os resultados deste estudo mostraram uma mediana de idade de 68,3 anos ao diagnóstico e predomínio do sexo feminino 50,8% (MAGALHÃES et al. 2010).

Recentemente, Belli et al. (2015) investigaram o perfil epidemiológico da SMD na América do Sul em 1080 pacientes com SMD *de novo*, envolvendo centros da Argentina (n=635), Brasil (n=345) e Chile (n=100). Os achados do estudo na população brasileira mostraram uma idade média de 65 anos e discreto predomínio do sexo masculino nos pacientes brasileiros (55,94%). Em relação à classificação da OMS (2008), houve uma predominância de casos de citopenias refratária com displasia de múltipla linhagem (CRDM) (30,4%), seguida de anemia refratária com excesso de blastos 2 (AREB-2) e anemia refratária com excesso de blastos 1 (AREB-1). Quando estratificados pelo Sistema Internacional de Pontuação Prognóstica (IPSS) revisado (IPSS-R), 34% foram classificados como baixo risco e 23% como intermediário (BELLI et al. 2015).

1.2 Senescência e patogenia da SMD

O processo de envelhecimento celular é acompanhado de diversas alterações, como redução na síntese de células da linhagem eritróide e linfóide, bem como relativo aumento das linhagens mielóides. Tais mudanças no potencial hematopoético estão associadas a numerosas alterações na MO, incluindo a diminuição da celularidade, níveis alterados de quimiocinas/citocinas e alterações na composição e arquitetura das células não-hematopoiéticas que compõem o microambiente medular (LATCHNEY; CALVI, 2017). A caracterização das alterações celulares das células progenitoras hematopoéticas durante o envelhecimento tem impacto no ciclo celular, na resposta ao dano ao DNA e na expressão gênica (FLACH et al. 2014; PANG et al. 2013; ROSSI et al. 2005).

As alterações observadas durante o envelhecimento hematopoético são qualitativamente similares àquelas que ocorrem no contexto das síndromes de falência da MO adquiridas que também surgem em idosos, em particular as síndromes mielodisplásicas. No entanto, diferentemente da SMD, o envelhecimento hematopoético normal não está associado a alterações suficientes para produzir manifestações clínicas evidentes (CHUNG; PARK, 2017).

Alguns mecanismos para citopenias inexplicáveis em idosos têm sido propostos. Baixos níveis de testosterona podem contribuir para anemia leve em homens mais velhos. Alguns pesquisadores, talvez influenciados pela observação de que a celularidade da medula diminui progressivamente com a idade, propuseram disfunção progressiva de células-tronco e redução do potencial hematopoético como outro mecanismo comum para citopenias senis. Embora os indivíduos mais velhos tenham inúmeras alterações no fenótipo e no potencial de

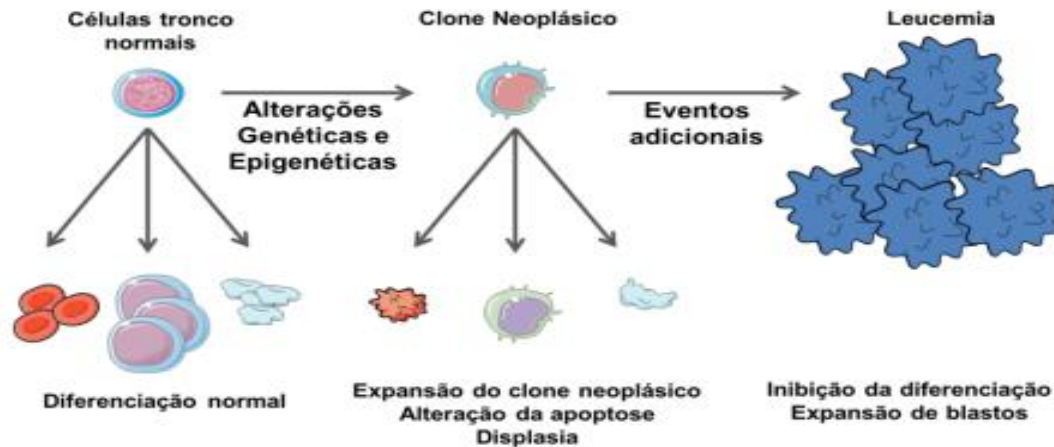
renovação das células-tronco hematopoéticas (CTHs), ainda há poucas evidências para relacionar essas alterações a citopenias inexplicadas na ausência de um processo clonal (STEENSMA, 2016). Em modelos murinos, as CTHs parecem aumentar em número com o envelhecimento, embora apresentem alterações imunofenotípicas e uma diminuição na capacidade de gerar células hematopoiéticas. A resistência adquirida do desenvolvimento de células eritróides à EPO e outras sinalizações de citocinas é outro mecanismo proposto (CHAMBERS; GOODELL, 2007).

A fisiopatologia da SMD é complexa e ainda não foi totalmente elucidada; no entanto, sabe-se que os principais fatores que contribuem para a ocorrência da doença são as mutações, as anormalidades epigenéticas e o microambiente medular pró-inflamatório (LEVINE; EBERT, 2011).

O evento inicial parece envolver uma lesão genética em uma célula hematopoética com capacidade de se diferenciar em células mielóides. Essa alteração leva à formação de um clone local. Através de novas mutações, essas células progenitoras adquirem crescimento preferencial em relação às outras células hematopoiéticas, caracterizando o perfil de citopenias bastante peculiar desta doença. As mutações iniciais nas células tronco podem causar bloqueio da diferenciação levando à displasia, enquanto defeitos subsequentes afetam a proliferação e susceptibilidade à apoptose causando expansão clonal das células aberrantes e LMA (BRUNNING et al. 2008; LOOK, 2005) (Figura 1).

Cerca de 90% dos pacientes com SMD apresentam uma ou mais mutações em oncogenes e dois terços delas são encontradas em pacientes com cariótipo normal. As principais mutação envolvidas no diagnóstico e prognóstico da SMD incluem aquelas associadas ao *splicing* do RNA (SF3B1, SRSF2, U2AF1 e ZRSR2), metilação do DNA (TET2 e DNMT3), modificação da cromatina (ASXL1 e EZH2), regulação da transcrição (RUNX1), reparo do DNA, (TP53) e transdução de sinal (NRAS e KRAS) (CAZZOLA; DELLA PORTA; MALCOVATI, 2013).

Figura 1: Representação da patogênese da Síndrome Mielodisplásica



Fonte: Adaptado de ISSA, 2013.

Tem sido demonstrado que o estado pró-inflamatório é capaz de estimular o sistema imune inato e a senescência hematopoiética, estando relacionado com a heterogeneidade fenotípica de pacientes com SMD (CLUZEAU et al. 2017). Diversas alterações no sistema imunológico são responsáveis pelo processo inflamatório e de autoimunidade. Alguns pacientes com SMD tratados com Terapia Imunossupressora apresentam resposta satisfatória, indicando o papel relevante do sistema imune na patogênese da SMD. Essas alterações inflamatórias podem preceder e facilitar a evolução clonal de pacientes com SMD (WOLACH; STONE, 2016; YANG et al. 2015).

Alterações autoimunes são encontradas em cerca de 10 a 20% dos pacientes com síndrome mielodisplásica e pode variar de manifestações clínicas limitadas, como anemia hemolítica autoimune a doenças sistêmicas que afetam múltiplos órgãos, como vasculites sistêmicas, poliartrite e doenças do tecido conjuntivo (GRIGNANO et al. 2018). A desregulação no sistema imune, que inclui alteração nas citocinas, células *natural killers*, linfócitos T e outras, pode representar um evento primário na SMD e ter um papel chave na sua evolução (CHEN, 2013). Mekinian et al. 2014, observaram num estudo multicêntrico uma associação clínica entre doenças auto-imunes e inflamatórias, como tireoidite, dermatite granulomatosa e inflamação artrose, sugerindo que um processo inflamatório atua diretamente na patogênese da SMD.

As citocinas são elementos cruciais na interação do clone com o microambiente, juntamente com a hematopoese ineficiente na SMD e podem influenciar uma variedade de manifestações clínicas que caracterizam a doença. O fator de necrose tumoral α (TNF- α), por

exemplo, modula o perfil da expressão gênica de células do estroma medular na SMD induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-8, e IL-32 (MARCONDES, 2008); é capaz de afetar as taxas de apoptose intramedular e interferir na resposta ao tratamento com eritropoietina (STASI et al. 1997). Níveis elevados de interferon- γ (IFN- γ) também foram observados no plasma da medula óssea de pacientes com SMD, bem como de IL-6 (SELLERI et al. 2002).

Estudos como o de Epling-Burnette et al. (2007) sugerem o envolvimento de linfócitos TCD8⁺, onde foi observado uma expansão mono/oligoclonal dessas células em pacientes com SMD comparado ao controle. Além disso, Vercauteren et al. (2012), sugeriram que os linfócitos TCD8⁺ na SMD são originados de um clone anômalo. Células T senescentes tendem a secretar citocinas inflamatórias que podem contribuir com o fenótipo da doença. A depleção de linfócitos Treg em número e função está associada à autorreatividade, enquanto que seu aumento pode promover a tumorigênese através da perda da vigilância imunológica.

Um aumento na secreção de várias citocinas inflamatórias é frequentemente observado na SMD e está ligado a vários aspectos do fenótipo da doença. A IL-1, IL-6, IL-8 e o TNF- α afetam negativamente a hematopoese, regulam a inflamação e promovem a apoptose mediada por Fas das células CD34⁺ da medula. (BACHEGOWDA et al. 2013).

1.3 Diagnóstico da SMD

Devido à inespecificidade dos sinais e sintomas, o diagnóstico de SMD é um dos mais complexos dentre as neoplasias mieloides. O diagnóstico da SMD deve levar em consideração os achados clínicos e laboratoriais (hematológicos, citológicos, histológicos, bioquímicos e genéticos) (MALCOVATI et al. 2013). Os principais achados hematológicos na SMD são displasias, citopenias e assincronismo maturativo. Além disso, alterações como: presença de sideroblastos em anel, fragmentação nuclear dos eritroblastos, bastonetes gigantes, granulócitos hipersegmentados e anomalia pseudoPelger-Huët podem ser encontradas (VARDIMAN et al. 2006).

A citopenia é uma condição *sine qua non* para o diagnóstico de SMD. Os seguintes valores são considerados para caracterizar citopenia: hemoglobina <13g/dL (homem) e <12g/dL (mulher), plaquetas <150×10³/mm³ e contagem absoluta de neutrófilos <1.8×10³/mm³. A presença de alterações displásicas deve ser superior a 10% (WEINBERG, HASSERJIAN., 2019).

Os critérios de diagnóstico para SMD têm o objetivo inicial de excluir outras causas de citopenia e displasia, bem como outras doenças clonais da CTH. Sendo assim, a abordagem para SMD deve iniciar com a exclusão de causas não malignas de citopenias, como doenças infecciosas e autoimunes. Após a realização do protocolo de exclusão, o estudo morfológico é essencial para avaliar a presença de displasia celular e número de blastos na MO, bem como a biópsia óssea e o cariótipo. Ao diagnóstico podem ocorrer situações onde os achados clínicos e laboratoriais são sugestivos de SMD, mas os achados morfológicos não são conclusivos, como na síndrome de anemia do idoso (MALCOVAT et al. 2013; VALENT et al. 2007; VARDIMAN et al. 2009).

As diretrizes da OMS exigem a análise do grau de displasia de células hematopoiéticas que, por ser subjetiva, pode apresentar baixa reprodutibilidade entre os indivíduos. Pessoas idosas saudáveis normalmente apresentam células displásicas do sangue e da medula semelhantes às encontradas em pacientes com SMD (GLAUSER et al. 2013). Por isso, o diagnóstico diferencial da SMD também deve ser realizado para distinguir situações recém-identificadas, encontradas principalmente em pacientes com doença inicial e de baixo risco. Essas condições conhecidas como transtornos mieloides indolentes englobam 4 grupos: citopenia idiopática de significância desconhecida (ICUS), displasia idiopática de significado desconhecido (IDUS), hematopoese clonal de potencial indeterminado (CHIP) e citopenia clonal de significância desconhecida (CCUS). Baseado em mutação somática, anormalidade cariotípica clonal, displasia medular e citopenia(s), os pacientes podem ser classificados dentro desse espectro, e podem evoluir para SMD ou LMA (CARGO et al. 2015).

A ICUS caracteriza-se por citopenias sem a presença dos critérios morfológicos considerados para o diagnóstico da SMD (MALCOVATI; CAZZOLA, 2015). A presença de displasia medular >10% sem citopenia periférica corresponde à IDUS. Há ainda condições clonais, como a CCUS, em que mutações estão presentes com a citopenia, porém sem displasia. Em indivíduos mais idosos, a presença de alterações clonais sem evidência de doença hematológicas é identificada como CHIP (MALCOVATI; CAZZOLA, 2015; VALENT et al. 2018;). A tabela 1 resume as principais características que direcionam o diagnóstico dentro dessas categorias em comparação à SMD.

Aproximadamente 25% dos pacientes com ICUS podem evoluir para SMD ou LMA. Entretanto, essa proporção aumenta substancialmente de 9% a 82% em cinco anos na presença de mutações altamente preditivas (HANSEN, 2016; MALCOVATI; GALLI; TRAVAGLINO, 2017).

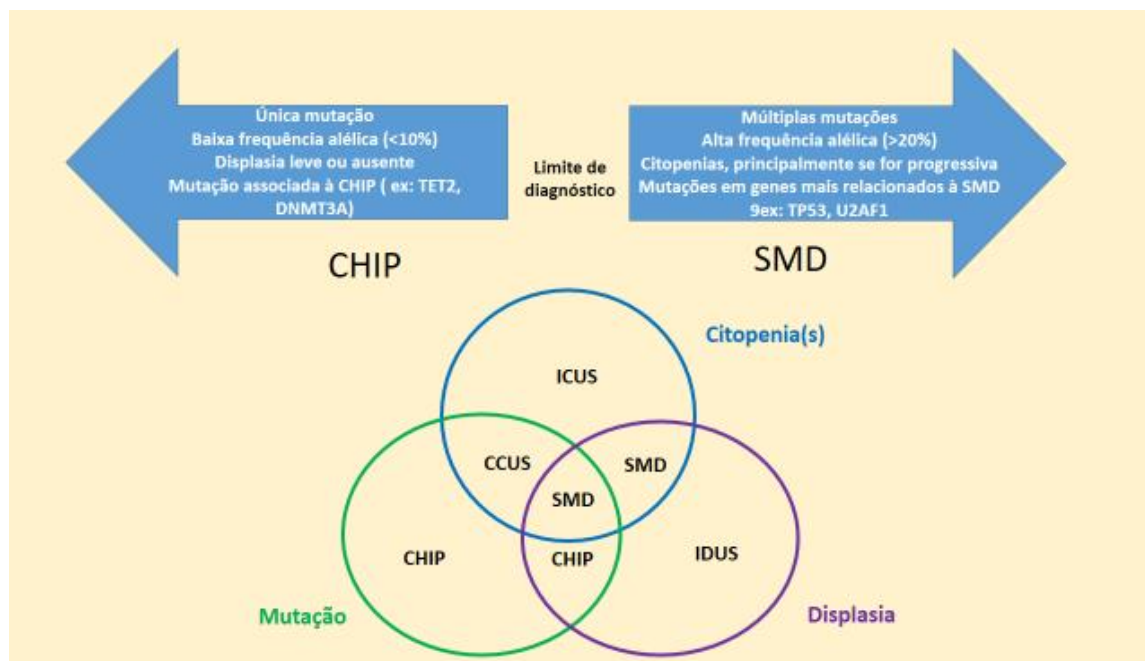
Tabela 1 – Caracterização dos neoplasmas indolentes segundo OMS 2016.

Classificação	Citopenia	Displasia medular	Alteração citogenética	Mutações somáticas	Comentários
ICUS	+	-	-	-	Grupo heterogêneo. Condição que pode ser revertida com o tempo, fechar diagnóstico de SMD ou de outras doenças.
IDUS	-	+	-	-	É um termo mais raramente usado para descrever a presença de uma morfologia celular anormal de causa desconhecida na ausência de citopenias.
CHIP	-	-	+/-	+/-	Comum em indivíduos idosos saudáveis. Apresenta risco de evolução de 0,5 a 1,0%. Poderia ser considerada uma subclassificação do CHIP, com um risco maior de progressão para LMA. Pode ser CHP +, outra causa para citopenia ou uma neoplasia hematológica de fato. Os pacientes geralmente apresentam duas ou mais mutações detectáveis.
CCUS	+	-	+/-	+/-	Doença clonal. Citopenia é obrigatória. Displasia geralmente é extensa.
SMD	+	+	+/-	+/-	No futuro, presença de mutações ou um conjunto delas poderá definir a doença, mesmo sem a presença de displasia. A SMD com excesso de blastos pode ser considerada uma forma oligoblástica de LMA.

Fonte: adaptado de Steensma, (2016) e do NationalComprehensiveCancer Network versão, (2017.2).

A figura 2 mostra a relação entre a presença de mutação em pacientes citopênicos sem displasia extensa, excesso de blastos ou cariótipo sugestivo de SMD.

Figura 2: Interpretação das mutações no diagnóstico de pacientes com citopenias inexplicadas.



Fonte: adaptado de Steensma, (2016).

1.4 Citogenética na SMD

As alterações cromossômicas fornecem informação úteis para o diagnóstico, prognóstico e/ou tratamento, no entanto, nenhuma anomalia cromossômica é patognomônica destas doenças (MALCOVATI; NIMER, 2008).

Alterações cromossômicas clonais na SMD podem ser observadas em 30% a >80% dos pacientes, dependendo do subtipo e da classificação (*de novo* ou secundária à quimioterapia) (HAASE, 2008; NIBAKKEN, BAGG, 2014). Nos 20%-70% restantes de pacientes com um cariótipo normal, há evidências de que alterações sub-microscópicas como mutações pontuais, micro-deleções, micro-amplificações, alterações epigenéticas ou dissomia uniparental de número de cópias fornecem a base genética para a doença (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011). O cariótipo também tem o maior peso prognóstico de todos os parâmetros no IPSS-R (GREENBERG, 2012).

De acordo com o Sistema Internacional para a Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN, 2005), um clone anormal é definido por pelo menos duas metafases com o mesmo cromossomo supranumerário ou mudança estrutural, ou pelo menos três metafases com a perda do mesmo cromossomo. Anormalidades complexas são definidas como três ou mais anormalidades independentes em pelo menos duas metafases.

As alterações mais frequentes são as monossomias e as deleções dos cromossomos 5 (-5 /del5q) e 7 (-7 /del7q) (SCHANZ, 2012). A SMD associada com del(5q) ocorre primariamente no sexo feminino e é caracterizada por megacariócitos hipolobulados, anemia refratária macrocítica, contagem de plaquetas normal ou aumentada e curso clínico favorável (BRUNNING et al. 2008).

Na SMD de baixo risco, geralmente as alterações citogenéticas são isoladas, enquanto que nas SMD de alto risco são associadas. A trissomia do cromossomo 8 é a alteração numérica mais comum e não está associada a nenhum subtipo especificamente. Algumas alterações cariotípicas que não possuem especificidade diagnóstica (por exemplo: -Y, +8, del(20q) isoladas não são suficientes para o diagnóstico de SMD. A nulissomia do Y ocorre em aproximadamente 10% dos idosos e pode representar um clone maligno ou um fenômeno senescente na MO (SCHANZ et al. 2012).

Os cariótipos complexos são observados em cerca de 20% dos doentes com SMD primária e em mais de 90% dos pacientes com SMD secundária (OLNEY; LE BEAU, 2002). De acordo com critérios internacionais, as anomalias cromossômicas complexas nas SMD definem-se pela ocorrência simultânea de 3 ou mais anomalias independentes. Essas resultam de um processo de acumulação sequencial de anomalias, observado na evolução do cariótipo (HAASE, 2008).

1.5 Classificação e Prognóstico da SMD

Em 1976 ocorreu a primeira classificação da SMD, proposta pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), baseada em parâmetros morfológicos observados no sangue periférico e na MO. De acordo com esta classificação, os pacientes eram diagnosticados com SMD quando apresentavam MO displásica e/ou com 5 a 30% de mieloblastos. Essa classificação foi revisada em 1982 e durante 25 anos foi utilizada como guia para diagnóstico e classificação desse grupo heterogêneo de doenças

(BENNET et al. 1982). Foram criados os seguintes subgrupos: Anemia Refratária (AR), Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB), Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) e Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação (AREB-T) (Tabela 2).

Tabela 2: Evolução da classificação da Síndrome Mielodisplásica até 2008.

Classificação SMD					
FAB (1982)	OMS (2001)	OMS (2008)		Blastos (%)	
Subgrupos		Displasia Medular		Medula Óssea	Sangue Periférico
AR	AR SMDU CRDM del 5q -	CRDU AR NR/TR CRDM del 5q isolada SMD-U	Eritróide Não Eritróide Eritróide + outra Eritróide + mega Unilinhagem + pancito ou CRDM/ CRDU com 1% de blastos no SP.	< 5 < 5 < 5 < 5 < 5	< 1 < 1 < 1 < 1 < 1
ARSA	ARSA CRDM - AS	ARSA	Eritróide* *>15% sideroblastos em Anel.	< 5 < 5	< 1 < 1
AREB	AREB-I AREB-II	AREB-I AREB-II	≥ 1 linhagem ≥ 1 linhagem	5-9 10-19	2-4 5-19
AREB-t	LMA		Mielóide + outra	≥20	
LMMC	SMD/DMP LMMC LMMJ LMCa SMD/DMP-U	SMD/SMP LMMC LMMJ LMC BCR/ablneg SMD/NMP-U	Variável (monocitose>1 x 10 ⁹ /L)	<20	

Fonte: Adaptado de Bennet et al. 1982; Brunning et al. 2008; Vardiman et al. 2009. AR: Anemia Refratária; ARSA: Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel, AREB: Anemia Refratária com Excesso de Blastos, LMMC: Leucemia Mielomonocítica Crônica; AREB-T: Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação. SMD-U (SMD inclassificável), CRDM (citopenia refratária com displasia de multilinhagem), del 5q (deleção 5q isolada), CRDM-SA (CRDM com sideroblastos em anel), LMA (Leucemia mielóide aguda), SMD/DMP (SMD/doenças mieloproliferativas), LMMJ (Leucemia mielomonocítica juvenil), LMCa (Leucemia mielóide crônica atípica), SMD/DMP-U (SMD/ doenças mieloproliferativas inclassificáveis), CRDU (citopenias refratárias com displasia unilinhagem), NR (neutropenia refratária), TR (trombocitopenia refratária), SMD/NMP (SMD/neoplasias mieloproliferativas), SMD/NMP-U (SMD/neoplasias mieloproliferativas inclassificáveis).

Em 1999, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs modificações na classificação FAB com o intuito de aprimorar o valor prognóstico da SMD e publicou, em 2001, uma nova classificação, estratificando subtipos que apresentavam comportamento clínico semelhante e associando a imunofenotipagem e a genética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citoquímicos já empregados (BORTOLHEIRO, 2006).

Uma das principais mudanças foi a redução no número mínimo de bastos na MO para o diagnóstico de LMA de 30 para 20%. Além disso, foram excluídos os subtipos AREB-t e LMMC; este último foi considerado um quadro intermediário entre SMD e doenças mieloproliferativas crônicas, junto com a leucemia mielomonocítica juvenil e a leucemia mieloide crônica atípica (BORTOLHEIRO, 2006). A categoria Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM) foi criada e definida como displasia em mais de 10% das células de cada linhagem, com maior grau de insuficiência medular e curso mais agressivo. A síndrome do 5q- foi colocada separadamente por constituir um grupo de ótimo prognóstico e características bem definidas, como número de plaquetas elevado ou normal e a presença de megacariócitos. A AREB foi dividida em I e II, de acordo com a porcentagem de blastos na MO. Foram criados ainda os grupos Síndrome Mielodisplásica Não Classificada (SMD-U) Síndrome Mielodisplásica/Doença mieloproliferativa (SMD/DMP) (JAFJE et al. 2001).

Em 2008, a classificação da OMS foi atualizada. A principal modificação realizada foi a definição de três categorias de citopenia refratária com displasia unilinhagem (CRDU): a anemia refratária (AR), a neutropenia refratária (NR) e a trombocitopenia refratária (TR) Essa alteração visava aprimorar a estratificação de pacientes, reduzindo o número de casos não classificados. (JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008).

A última revisão da classificação da OMS foi realizada em 2016, onde foram realizados alguns refinamentos relacionados à interpretação da morfologia e caracterização da citopenias, além da adição da informação genética no diagnóstico e na classificação. O termo “Citopenia refratária” foi retirado. O subtipo anemia refratária com sideroblastos em anel (SMD-AS) foi estratificada de acordo com o número de linhagens displásicas (única ou multilinhagem). A versão OMS 2016 incluiu na categoria SMD com sideroblastos em anel (SA) pacientes que apresentam a mutação no gene *Splicing factor 3B subunit 1* (SFB3), mutado em aproximadamente 80% dos casos

com sideroblastos em anel (MALCOVATI et al, 2015). Nos pacientes de maior risco, os termos Anemia refratária com excesso de blastos (AREB) 1 ou 2 foram simplificados para síndrome mielodisplásica com excesso de blastos (SMD-EB) 1 ou 2 para enfatizar a importante porcentagem dos blastos, que direciona a terapia (BENNET, 2016).

Tabela 3: Classificação da SMD segundo OMS 2016.

CLASSIFICAÇÃO OMS 2016					
Subgrupo	Linhagens com displasia	Citopenias*	% de Sideroblastos em anel na MO	% Blastos MO/SP	Citogenética
SMD com displasia em única linhagem (SMD-DUL)	1	1 ou 2	<15% <5% [‡]	MO <5% SP <1% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração, exceto a que preencha os critérios diagnósticos para SMD com del(5q) isolada
SMD com displasia em múltiplas linhagens (SMD-DML)	2 ou 3	1-3	<15% <5% [‡]	MO <5% SO <1% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração, exceto a que preencha os critérios diagnósticos para SMD com del(5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel					
SMD com sideroblastos em anel com displasia em única linhagem (SMD-SA-DUL)	1	1 ou 2	≥15% ≥5% [‡]	MO <5% SP <1% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração, exceto a que preencha os critérios diagnósticos para SMD com del(5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel com displasia em múltiplas linhagens (SMD-SA-DML)	2 ou 3	1-3	≥15%/≥5% [‡]	MO <5% SP <1% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração, exceto a que preencha os critérios diagnósticos para SMD com del(5q) isolada
SMD com del(5q) isolada	1-3	1-2	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP <1% Bastonete de Auer ausente	del(5q) isolada ou com 1 anormalidade adicional, exceto -7 ou del(7q).
SMD com excesso de blastos					

SMD com excesso de blastos 1	0-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO 5%-9% SP 2%-4% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração.
SMD com excesso de blastos 2	0-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO 10%-19% SPB 5%-19% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração.
SMD inclassificável					
Com 1% de blastos	1-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP = 1%, [‡] Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração.
Com displasia em única linhagem e citopenia	1	3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP <1% Bastonete de Auer ausente	Qualquer alteração.
Baseada na definição da anormalidade citogenética	0	1-3	<15% [§]	MO <5% SP <1% Bastonete de Auer ausente	Alteração que define o subtipo de SMD.
Citopenia refratária da infância	1-3	1-3	Nenhuma	MO <5% SP <2%	Qualquer alteração.

Fonte: ARBER et al. 2016. Legenda: Medula Óssea (MO); Sangue Periférico (SP); Síndrome mielodisplásica (SMD). Nota: (*) Citopenias, definidas como: hemoglobina, <10 g/dL, contagem de plaquetas, <100 × 10⁹ / L e contagem absoluta de neutrófilos <1,8 × 10⁹ / L. Raramente, a SMD pode apresentar anemia leve ou trombocitopenia acima destes níveis. A contagem absoluta de monócitos no SP deve ser <1×10⁹/L. (†) Se a mutação *SF3B1* estiver presente. (‡) Um por cento de blastos no SP deve ser registrado em, pelo menos, duas ocasiões distintas. (§) Casos com ≥15% sideroblastos em anel, por definição, têm significativa displasia eritróide, e são classificados como SMD-AS-DUL.

1.6 Tratamento da SMD

Alguns fatores devem ser considerados no manejo do paciente com SMD, como a idade avançada da maioria dos pacientes, presença de comorbidades e tolerabilidade a algumas condutas terapêuticas intensivas. Além disso, quando o paciente evolui para LMA, as taxas de resposta à quimioterapia são menores do que nos casos de LMA *de novo*. As opções terapêuticas para SMD incluem cuidados de suporte, terapia de baixa intensidade e terapia de alta intensidade, incluindo o transplante de células tronco-hematopoéticas (TCTH) e ensaios clínicos (CHESON et al. 2006; GREENBERG et al., 2017).

Para o tratamento da citopenias em pacientes de baixo risco são empregados o fator estimulante de eritropoetina e o fator estimulante de colônias granulocíticas. As características preditivas de resposta à eritropoietina nesse grupo são: baixos níveis basais de eritropoietina, pequena porcentagem de blastos na medula e baixa necessidade transfusional (GIRALDO et al. 2006).

O TCTH é a única opção curativa para SMD. Entretanto, diversos fatores relacionados ao paciente e ao doador limitam a elegibilidade dos casos. Para os pacientes que não são candidatos ao transplante de CTH, os hipometilantes, como azacitidina e decitabina constituem a primeira linha de tratamento para os casos de maior risco ou em progressão (LUBBERT et al. 2011). Quando comparados à terapia de suporte, promovem uma melhor resposta hematológica. Tem sido demonstrado, também, uma redução no risco de transformação para LMA, com melhora da sobrevida (FENAUX et al. 2009). A quimioterapia intensiva pode ser empregada nos casos de mais alto risco, quando não há doador compatível, ou quando é necessário reduzir o número de blastos previamente ao transplante de CTH (BERAN et al. 2001).

Os agentes modificadores de resposta biológica e agentes imunossupressores, como globulina antimocítica, ciclosporina e lenalidomida, tem mostrado eficácia nos casos de SMD com HLA-DR15, variante hipocelular, citogenética normal, baixo risco e com clone Hemoglobinúria Paroxítica Noturna (HPN) (DUNN et al. 1999; SAUNTHARARAJAH et al. 2002).

A lenalidomida é uma agente imunomodulador com atividade em pacientes de baixo risco. Os resultados benéficos têm sido particularmente evidentes para pacientes com del(5q). Os pacientes apresentam melhora de dependência transfusional, alcançam a resposta hematológica e citogenética. Devido à mielossupressão, como evento adverso, o

monitoramento através do hemograma, durante o período de tratamento é obrigatório (GIAGOUNIDIS et al. 2014; LIST; KURTIN; ROE, 2005; SWERDLOW et al. 2008). Um dos efeitos da lenalidomida sobre a hematopoese ocorre devido a sua ação anti-angiogênica. Esse efeito é mediado pela inibição da migração das células endoteliais. O mecanismo pelo qual a lenalidomida inibe a migração de células endoteliais induzidas por VEGF pode estar relacionado à inibição induzida por VEGF (LU et al. 2009).

1.7 Estratificação de risco e Prognóstico da SMD

Nos últimos anos, o avanço de técnicas moleculares, como sequenciamento de próxima geração (NGS) forneceu novos *insights* para o entendimento da fisiopatologia da SMD levando à descoberta de novos marcadores de diagnóstico e de prognóstico (ARBER et al. 2016; GREENBERG et al. 2012). Assim, o acúmulo de nova informação e experiência em relação à SMD tornou necessária uma nova revisão. A Classificação da OMS 2016 introduziu a influência da informação genética no diagnóstico e classificação da SMD, além do refinamento na citopenia e mudanças morfológicas (HONG; HE, 2017)

Apesar de o diagnóstico da SMD ser essencial, visto que a história natural da doença inclui um risco de morte por citopenias progressivas ou evolução para a LMA, garantir um diagnóstico de SMD pode ser um desafio, particularmente nos estágios iniciais da doença, quando alterações morfológicas e celulares associadas à doença podem ser sutis (STEENSMA, 2016).

Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar essas alterações. Dentre eles, redução dos níveis de testosterona em homens idosos, resistência das células eritróides à eritropoietina, redução na capacidade das células progenitoras em gerar células hematopoéticas, dentre outros. Vários termos têm sido usados para descrever indivíduos com citopenias inexplicadas, mutações clonais ou ambas.

Devido à heterogeneidade apresentada pelos indivíduos com SMD, foram propostos sistemas de estratificação de risco que assumem papel fundamental na SMD na escolha da opção terapêutica e na monitorização da evolução da doença. Os principais fatores prognósticos incluem a presença e o grau de citopenia, a porcentagem de blastos na medula e as alterações citogenéticas. Outros fatores incluem a presença de fibrose em grau ≥ 2 , mutações somáticas e parâmetros avaliados por citometria de fluxo, porém os dois últimos são

pouco utilizados na prática clínica (DELLA PORTA et al. 2009; VAN DE LOOSDRECHT et al. 2008).

O sistema de modelo prognóstico desenvolvido por Greenberg et al. (1997) é um dos sistemas mais utilizados e denomina-se Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS), o qual foi resultado de um modelo de prognóstico baseado em 816 pacientes com SMD primária, avaliados em sete estudos prévios. O sistema de pontuação considera a porcentagem de blastos da MO, o número de citopenias periféricas e o cariótipo dividido em três categorias. O valor de IPSS é obtido pela somatória dos valores individuais das três variáveis. De acordo com o IPSS, os pacientes com SMD podem ser estratificados nos seguintes grupos: baixo risco (bom prognóstico); risco intermediário 1 e risco intermediário 2 (prognóstico intermediário); e alto risco (prognóstico desfavorável) (VARDIMAN, 2009) (TABELA 4).

Os quatro grupos mostram diferenças significativas na sobrevida global e no risco de transformação para LMA. A sobrevida média varia de 5,7 anos para pacientes de baixo risco a 0,4 anos para pacientes de risco elevado (GREENBERG et al. 1997).

Em 2010, o IPSS foi revisado baseado nos achados de um estudo multicêntrico envolvendo 7.012 pacientes com SMD. O IPSS-R (TABELA 4) expandiu de 3 para 5 o número de subgrupos citogenéticos de prognóstico com classificações específicas. Dados como idade do paciente ao diagnóstico, quantificação de ferritina sérica e lactato desidrogenase foram consideradas importantes características para a sobrevida, mas não para a transformação da leucemia mielóide aguda (GREENBERG et al. 2012).

Tabela 4: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) para SMD.

Variável	Escore						
	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
Cariótipo*	Muito bom	–	Bom	–	Intermediário	Ruim	Muito ruim
Blastos (%)	≤ 2	–	> 2 a < 5	–	–	> 10	–
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10	–	8 a < 10	< 8	–	–	–
Neutrófilos (/mm³)	≥ 800	< 800	–	–	–	–	–
Plaquetas (x10³/mm³)	≥ 100	50 – 100	–	–	–	–	–

Fonte: Greenberg et al. (2012). Nota: Muito bom: del(11q), -Y; Bom: Normal, del(20q), del(5q) isolada e dupla, del(12p); Intermediário: +8, 7q-, i(17q), +19, +21, qualquer outra alteração isolada ou dupla, clones independentes; Ruim: inv(3)/t(3q)/del(3q), -7, anormalidades duplas incluindo -7/del(7q), presença de 3 anormalidades; Muito ruim: presença de > 3 anormalidades.

Essas alterações permitiram uma análise mais precisa do prognóstico (GREENBERG et al. 2012) (Tabela 5).

Tabela 5: Classificação de risco e estimativa de sobrevida segundo o Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R) para SMD.

Classificação de risco	Pontuação	Sobrevida Média (anos)	Média de tempo de Evolução para LMA, 25%, ano
Muito baixo	≤ 1,5	8,8	-
Bom	> 1,5 a 3,0	5,3	10,8
Intermediário	3,0 a 4,5	3,2	3,2
Alto	> 4,5 a 6	1,6	1,4
Muito alto	> 6 0	0,8	0,73

Fonte: Greenberg et al. (2012).

Apesar da ampla utilização dos sistemas de escores prognósticos para a SMD na prática clínica, algumas variáveis importantes associadas à sobrevida desses pacientes ainda não foram contempladas (KOMROKJI et al. 2012). Devido à heterogeneidade dos pacientes tanto ao diagnóstico quanto em relação à evolução da doença, novos marcadores de prognóstico tem sido alvos constantes de estudo, na tentativa de estratificar melhor e aumentar o poder preditivo dentro dos grupos de risco. Os elementos de maior interesse para os sistemas de pontuação de prognóstico são as características moleculares (BEJAR et al. 2011; HAFERLACH et al. 2014).

Vários estudos têm identificado mais de 40 mutações recorrentes em pelo menos 80% dos pacientes com SMD. As mais frequentes são TET2, SF3B1, ASXL1, DNMT3A, SRSF2, RUNX1, TP53, U2AF1, EZH2, ZRSR2, STAG2, CBL, NRAS, JAK2, SETBP1, IDH1, IDH2 e ETV9996. Várias dessas mutações gênicas estão associadas a características adversas, como cariótipos complexos (*TP53*), excesso de blastos na MO (*RUNX1*, *NRAS*, e *TP53*) e trombocitopenia grave (*RUNX1*, *NRAS* e *TP53*) (BEJAR et al. 2011; HAFERLACH et al. 2014; PAPAEMMANUIL; GERSTUNG; MALCOVATI, 2013).

1.8 Gene *TP53* na Mielodisplasia

Um dos genes mais frequentemente mutados nas neoplasias é o gene *TP53*. Conhecido como guardião do genoma, ele atua na preservação da integridade do DNA, sintetizado na fase S do ciclo celular. É um gene de supressão tumoral envolvido na resposta celular a danos no DNA (KASTENHUBER; LOWE, 2017).

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17, na região p13.1, e possui aproximadamente 20kb de comprimento. Codifica uma proteína de 53kDa, denominada proteína 53 (p53). Esta fosfoproteína nuclear funciona como fator de transcrição de sequência específica que está diretamente relacionado com a regulação do ciclo celular, indução da morte celular programada, reparo do DNA, senescência e metabolismo energético (BENSAAD; VOUSDEN, 2007; CHEUNG; VOUSDEN, 2010). Quando ativada, a proteína p53 é capaz de induzir a expressão de genes, como *CDKN1* e *Bax*, levando a uma parada no ciclo celular (pontos de checagem) ou induzindo a apoptose, através da ativação da transcrição de genes pró apoptóticos.

Quando o gene *TP53* é inativado ou suprimido, a célula perde a capacidade de responder a danos ao DNA e favorecer o reparo deste, o que propicia o acúmulo de mutações adicionais que configurarão o fenótipo tumoral (KASTENHUBER; LOWE, 2017).

As mutações do *TP53* na SMD *de novo* ocorrem em 8-12% dos casos e estão fortemente associadas a cariótipos complexos e monossômicos. Entretanto, aproximadamente 50% dos pacientes com cariótipo complexo não tem anormalidade detectável no gene *TP53* e apresentam uma sobrevida global comparável àqueles com cariótipos não complexos. Portanto, o status das mutações em *TP53* podem ser úteis para refinar o prognóstico destes pacientes tipicamente considerados como tendo doença de alto risco (KULASEKARARAJ; MOHAMEDALI; MUFTI, 2013).

Pacientes com del(5q), seja como anormalidade isolada ou frequentemente como parte de um cariótipo complexo, têm uma taxa mais elevada de mutações concomitantes em *TP53* (SEBAA et al. 2012; JADERSTEN et al. 2011). Essas mutações estão associadas à redução na resposta ou recaída após o tratamento com lenalidomida. Nestes casos, tais mutações podem ser eventos secundários e estão frequentemente presentes em pequenos subclones que podem se expandir durante o tratamento (JADERSTEN et al. 2009; MALLO et al. 2013).

A presença de mutações em p53 é caracterizado como um fator independente de mau prognóstico, estando relacionada a manifestações clínicas mais graves, trombocitopenia,

aumento no número de blastos, resistência à lenalidomida, recidiva e pior sobrevida (GANGAT; PATNAIK, TEFFERI, 2015).

Quanto aos pacientes considerados como baixo risco com cariótipo normal, mutações no gene *TP53* têm sido associadas a um prognóstico desfavorável, baixa resposta ao tratamento e sobrevida reduzida (KULASEKARARAJ et al. 2013). O papel desse gene nos pacientes de baixo risco, ainda não está elucidado, porém é sugerido que essas mutações ocorram no início do curso da doença (JÄDERSTEN et al.2011)

1.9 Angiogênese na SMD

Angiogênese e vasculogênese constituem dois processos biológicos distintos de fornecimento de oxigênio e nutrientes para tecidos distantes. No período embrionário, a formação de novos vasos é essencial para sustentação dos órgãos em formação. No reparo de tecido, novos vasos são necessários para a sua sustentação. Porém, esses processos também se encontram presentes em algumas condições patológicas, como doenças isquêmicas e neoplasias (SAULLE; CASTELLI; PELOSI, 2016).

A descoberta das células endoteliais progenitoras (CEPs) modificou o pensamento de que a angiogênese só ocorreria no período embrionário. Asahara et al.(1997) introduziram a primeira demonstração sobre a presença de uma célula progenitora endotelial na circulação capaz de realizar a produção *de novo* de vasos, dirigida através das (CEPs).

Os estudos realizados nesse sentido levaram à identificação de pelo menos dois tipos de CPEs: (I) células hematopoéticas pro-angiogênicas, correspondendo a células de origem hematopoiética que promovem a angiogênese via efeito parácrino; (II) células formadoras de colônia endotelial (ECFCs) que são capazes de gerar uma progênie de células endoteliais fenotípicas e funcionalmente competentes capazes de formar vasos *in vivo*. Basicamente, dois tipos de células hematopoéticas proangiogênicas foram identificadas: uma com um fenótipo mais maduro e correspondendo a células monocíticas maduras e uma população de células progenitoras imaturas, correspondendo a células progenitoras hematopoéticas pró-angiogênicas (ROSE; ERZURUM; ASOSINGH, 2015).

O estudo das células hematopoiéticas proangiogênicas tem levado à conclusão de que elas derivam da diferenciação de um subconjunto de células progenitoras hematopoéticas, mobilizadas a partir de MO por fatores de crescimento angiogênicos e contribuem *in vivo* para

uma resposta angiogênica através de um efeito indireto baseado em mecanismos parácrinos (WARA et al. 2011).

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a microvasculatura exerce importante função na disseminação, progressão, latência e apoptose das células tumorais (MAKHNI et al. 2003), sendo associada a pior prognóstico no câncer de mama, melanoma e câncer de próstata. Estudos sobre o papel da angiogênese nas neoplasias hematológicas sugerem um importante impacto no desenvolvimento e progressão do mieloma múltiplo, linfoma e leucemia. Os fatores angiogênicos parecem promover o crescimento de blastos leucêmicos através de mecanismos autócrinos e parácrinos, especialmente na LMA (SALVEN et al, 1997; VACCA et al. 1995).

Na SMD, também é observado um aumento na angiogênese. Alguns estudos exploraram tanto células endoteliais circulantes (CECs) quanto células progenitoras endoteliais na SMD. Os resultados desses estudos forneceram evidências que o número de CECs e CEPs é consistentemente elevado em SMD (TEOFILLI et al. 2015).

Della Porta et al. (2008), observaram um aumento no número de CECs, sendo correlacionado positivamente com densidade microvascular (DMV) da MO e de forma negativa com o prognóstico internacional risco do sistema de pontuação Curiosamente, esses autores mostraram que uma proporção variável, mas significativa, das CECs exibem as mesmas alterações cromossômicas detectadas nas células hematopoiéticas. Teofili et al. (2015) observaram que os níveis de CEPs são acentuadamente aumentados em SMD de baixo risco comparados aos controles normais; além disso, as ECFCs derivadas de SMDs exibem várias alterações epigenéticas e foram menos competentes que aquelas derivadas de controles saudáveis para apoiar a hematopoese normal de células CD34⁺.

Estudos imuno-histoquímicos demonstram aumento da DMV na medula de pacientes com SMD, entretanto a correlação desses dados com os estágios da doença e com o valor prognóstico tem mostrado dados conflitantes. Alguns trabalhos notificam esse aumento mais expressivo em pacientes classificados como alto risco (KORKOLOPOULOU et al. 2001; ALEXANDRAKIS, 2005). Bellamy et al. (2001), mostraram que a distribuição vascular e a MVD do tecido da MO estavam associadas à sobrevida global em pacientes com SMD. Entretanto, nesse estudo não se verificou uma relação por exemplo, com o IPSS, amplamente utilizado para avaliar as características clínicas e o prognóstico da SMD. Em outros estudos, essa correlação não foi observada (LUNDBERG, 2006).

Madry et al. (2007), por sua vez, identificaram um aumento na DMV de indivíduos com SMD, comparados ao grupo controle, porém o estresse influenciou a sobrevivência dos pacientes. O valor de VEGF, também avaliado nesse estudo não foi significativamente maior nos pacientes comparados ao controle. Um dado interessante foi observado por Keith et al. (2007), em que durante a transformação de SMD para doença leucêmica evidente, houve uma diminuição da DMV, associada a uma mudança no perfil de produção na MO de citocinas pró-angiogênicas, tais como VEGF, bFGF, TNF- α , HGF, Ang-1 e Ang-2 para a citocina anti-angiogênica TGF- β .

1.10 Fator induzido por hipóxia (HIF)

Organismos aeróbicos necessitam de oxigênio para a produção de energia e sobrevivência dos tecidos. Assim, condições de privação do oxigênio geram estresse celular e, paradoxalmente, acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), danosas a estruturas, como proteínas e DNA. Em situações de hipóxia, diversos mecanismos de resposta adaptativa são acionados visando a manutenção do metabolismo e a homeostase. As células interrompem temporariamente o ciclo celular, reduzem o consumo de energia e liberam fatores pro-angiogênicos. Estes eventos são coordenados por várias vias celulares, incluindo resposta através da sinalização por mTOR e a regulação gênica por fatores induzidos pela hipóxia (HIFs) (MAJMUNDAR, 2010).

A hipóxia é uma característica essencial da medula óssea e fundamental no desenvolvimento de células hematopoéticas normais e leucêmicas. A sua característica única expõe essas células a um nicho dinâmico de sinais e respostas, capazes de influenciar o seu destino e a resposta à terapia, gerados por fatores induzidos por hipóxia, uma família de ativadores de transcrição, os quais controlam vários genes envolvidos na adaptação celular à hipóxia (SCHITO; REY; KONOPLEVA, 2017).

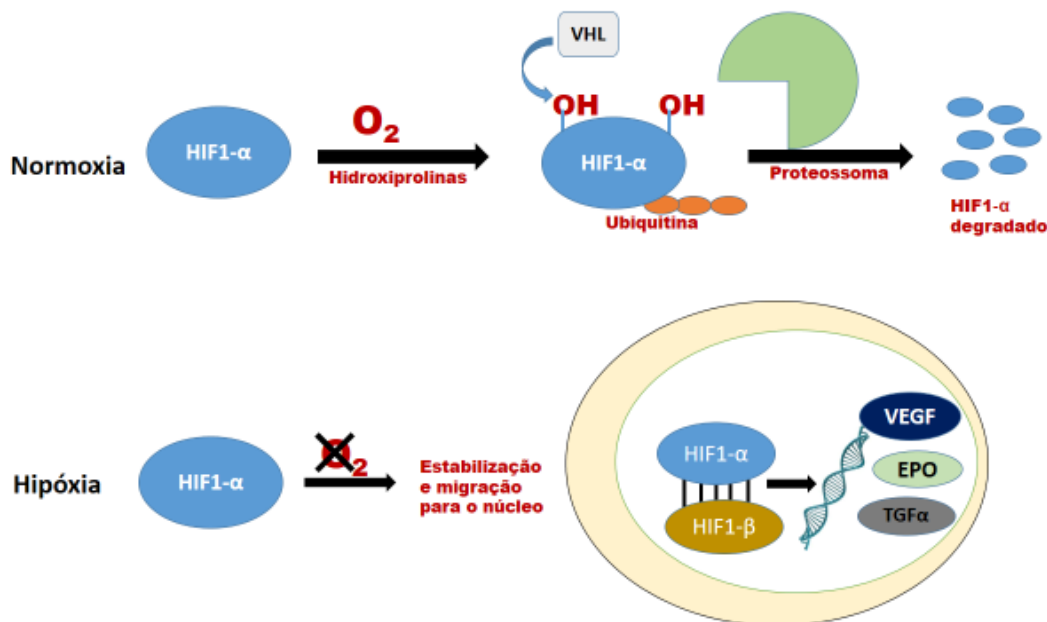
O HIF foi inicialmente identificado como um regulador da eritropoietina (EPO), porém atualmente é reconhecido como um modulador chave da resposta transcricional do estresse causado por hipóxia. Além de sua função adaptativa nas respostas ao estresse celular, estudos recentes revelam papéis importantes para o HIF em ambos os processos fisiológicos e patológicos (WANG, SEMENZA, 1995).

O Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1) é um fator de transcrição heterodimérico, formado por duas subunidades: HIF-1 α e HIF-1 β . Ambas são constitutivamente expressas.

Sob condições normais de oxigênio a subunidade HIF-1 β é estável, enquanto a subunidade HIF-1 α é rapidamente degradada por enzimas prolil-hidroxilases que promovem a hidroxilação de resíduos de prolina (Pro402 e Pro564). Esses resíduos hidroxilados são reconhecidos pelo fator de supressão tumoral Von Hippel-Lindau (pVHL), que marca a subunidade HIF-1 α para a degradação via ubiquitina-proteossoma (IVAN et al. 2001).

Em situações de hipóxia, os baixos níveis de oxigênio, necessário para que ocorram as hidroxilações e acetilações da subunidade do HIF-1 α , impedem sua degradação e a proteína se estabiliza no citoplasma. Em seguida, ela é translocada para o núcleo onde dimeriza-se à subunidade β , formando o fator de transcrição HIF-1. Este, por sua vez, se liga ao DNA transcrevendo genes relacionados às alterações nas concentrações de oxigênio (SEMENZA, 2013; WANG; SEMENZA, 1995) (Figura 3).

Figura 3: Representação esquemática da atividade do *HIF1- α* em condições de normóxia e hipóxia.



Fonte: Elaborada pela própria autora.

Legenda: Degradação da subunidade HIF1 α em condições de normóxia e sua estabilização e translocação para o núcleo em condições de hipóxia, culminando na ligação à subunidade beta, com ativação de genes alvos envolvidos na manutenção da homeostase celular, incluindo a angiogênese. VHL: Von Hippel-Lindau; HIF-1: Fator Induzido por Hipóxia-1; VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular; EPO: eritropoietina; TGF α : fator de crescimento tumoral α .

Além da hipóxia, outros fatores, como a ação de hormônios, citocinas (IL-1 β , TNF- α), fatores de crescimento insulina-like (IGF), ferro (Fe), óxido nítrico (NO) entre outros, são também capazes de estabilizar HIF-1 α . Esses processos requerem um mecanismo que envolve as EROs, indicando que a via não hipóxica é dependente de citocinas inflamatórias, principalmente IL-1 β e TNF- α (HADDAD, 2002).

A IL-1 β e a insulina estabilizam o HIF-1 α em condições normais de oxigênio e que esse mecanismo ocorre pela via da Fosfatidil-Inositol-3-kinase (PI-3K). Outra hipótese é a hiper regulação do HIF-1 α mediada pela IL-1 β que utiliza a via NF- κ B/COX2, demonstrando a relação entre a regulação do HIF-1 α e a inflamação, uma vez que o fator de transcrição NF- κ B é reconhecido como o maior regulador da transcrição de citocinas (STIEHL et al. 2002). Assim, a estabilização não hipóxica do HIF-1 α é feita por diferentes vias de sinalização (COIMBRA, 2004; JUNG et al. 2003; QIAN, 2004).

Os estímulos das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α ativam vias de sinalização intracelular, estimulando a liberação, pelas mitocôndrias, de EROs, que diminuem a hidroxilação do HIF-1 α e, conseqüentemente, inibem sua degradação. Além disso, o estímulo final comum das vias de sinalização, é o de ativar fatores de transcrição responsáveis por transcrever o RNAm do próprio HIF-1 α . Além dessa função, a via da PI-3K também libera o NF- κ B que transcreve os genes das principais citocinas inflamatórias, entre elas a IL-1 β e o TNF- α . A diminuição da degradação do HIF-1 α , associado ao aumento da expressão de seu RNAm, garantem sua estabilização celular não relacionada com a hipóxia (HADDAD, 2002; JUNG et al. 2003; QIAN, 2004; STIEHL et al. 2002).

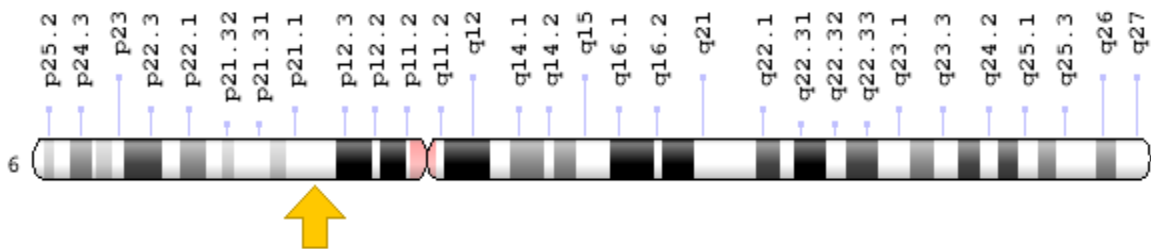
Alterações na sequência de nucleotídeos e na expressão da subunidade HIF-1 α têm sido associadas a diversas patologias. Uma revisão recente feita por Gladek et al. (2017), coletaram dados acerca de polimorfismos do HIF1-alfa. No total, 34 polimorfismos foram testados para uma associação com 49 fenótipos. Entre todos os polimorfismos coletados, 16 SNPs mostraram associações significativas com 40 fenótipos diferentes, incluindo seis SNPs associados a 14 tipos de câncer. As neoplasias hematológicas são frequentemente caracterizadas por alterações no microambiente da MO, que podem desencadear sinalização mediada por hipóxia e ativar fatores de transcrição, como o fator induzido por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α). O HIF-1 α pode aumentar a capacidade das células malignas de escapar dos principais mecanismos de *checkpoint* celular, como o direcionamento de p53, apoptose e autofagia durante a transformação (SEMENZA, 2004)

Tong et al. (2012), analisaram a expressão de HIF-1 α por imuno-histoquímica na MO de 81 pacientes com SMD, sendo observada em 49,4% (40/81) dos pacientes e foi considerada um marcador de prognóstico independente para a doença. Além disso, a expressão de HIF-1 α foi correlacionada com menor sobrevida global e progressão da doença. Houve uma associação com a porcentagem de blastos na MO, níveis de hemoglobina dados citogenéticos. Recentemente, Hayashi et al. (2018), demonstraram que a ativação do HIF-1 α é necessária e suficiente para desencadear um fenótipo displásico e citopênico em pacientes com SMD. Assim, o HIF1A se apresenta, cada vez mais, como um mediador patobiológico central da SMD e como um alvo terapêutico eficaz para um amplo espectro de pacientes.

1.11 Fator de crescimento vascular endotelial - VEGF

O gene *VEGF* humano está localizado no braço curto do cromossomo 6 na posição 21.1(6p21.1) e codifica um pré-mRNA de aproximadamente 14kb que possui 8 éxons separados por 7 íntrons (GIACCA, 2012) (Figura 4)

Figura 4: Localização do gene *VEGF* no cromossomo 6.



Fonte: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VEGFA#location>

Este gene é um membro da família dos fatores de crescimento PDGF/VEGF. Ele codifica uma proteína de ligação à heparina, que existe como um homodímero ligado a dissulfeto. Este fator de crescimento induz proliferação e migração de células endoteliais vasculares e é importante tanto para a angiogênese fisiológica quanto patológica. O bloqueio desse gene causa formação anormal de vasos sanguíneos embrionários em camundongos (WEIS; CHERESH, 2005).

Em diversas neoplasias ocorre uma super regulação desse gene e o aumento de sua expressão está correlacionada com o estágio e a progressão do tumor. Variantes alélicas deste gene têm sido associadas a complicações microvasculares de diabetes tipo 1 e aterosclerose.

Devido à clivagem alternativa, o gene *VEGFA* apresenta diversas isoformas, sendo *VEGFA* a mais frequente. Todas as isoformas mantêm os éxons de 1 a 5 que codificam respectivamente, a região sinalizadora, a porção N-terminal, o sítio de ligação do receptor VEGFR1, o sítio de ligação do receptor VEGFR2 e um sítio de clivagem de Plasmina. A isoforma VEGFA, tem a perda do éxon 6, responsável por codificar parte do sítio de ligação de heparina. Há também a criação de um *stop* códon na parte final do domínio C-terminal que é codificado pelo éxon 8. (CLAESSON-WELSH, 2012; KARAMAN; LEPPÄNEN; ALITALO., 2018; KOCH)

O VEGF-A é a isoforma mais estudada e desempenha um papel fundamental na proliferação endotelial, sendo um dos principais mediadores de angiogênese patológica e de indução da permeabilidade vascular. Estudos têm demonstrado um envolvimento da revascularização na progressão da doença em neoplasias hematológicas, caracterizada pela elevação dos níveis de VEGF-A e pela elevada expressão do fator induzido por HIF-1 α (AL-HABBOUBI et al. 2011; TICHELLI; GRATWOHL, 2008; PENACK et al. 2010; PENACK et al. 2011).

A angiogênese está intimamente associada à fisiopatologia da SMD e ao tratamento da doença. O VEGF pode ter um efeito regulatório no sistema hematopoético e pode contribuir para a progressão da doença. Estudos tem encontrado um aumento nos níveis de VEGF tanto no plasma como na medula de pacientes. Entretanto, os achados não são conclusivos quanto ao seu papel no desenvolvimento e na progressão da doença. Madry et al. (2007) relataram um aumento de VEGF em pacientes com SMD, principalmente nos subgrupos com excesso de blasto e leucemia mielomonocítica crônica, porém sem diferença significativa.

Kim et al. (2016) avaliaram a medula de 144 pacientes com SMD e observaram que apesar de não ter havido uma diferença significativa entre os diferentes subtipos de SMD, uma alta MDV e a forte expressão de VEGF parecem estar associadas à menor taxa de sobrevida.

Um trabalho recente avaliou o papel da expressão do gene *VEGF-A* e sua interação com receptores VEGFR1 e VEGFR2 no prognóstico de 24 pacientes com SMD. Nesse estudo, observou-se um aumento da expressão de VEGF nos indivíduos com maior risco para LMA e uma maior interação com o receptor VEGFR1. Além disso, houve correlação entre a expressão do gene *VEGF-A* e o número de blastos e entre a expressão de VEGFR1 e a sobrevida global (KALITIN et al. 2017).

Em outro estudo, a expressão de VEGF foi avaliada por imuno-histoquímica em 188 pacientes com SMD e verificou-se uma tendência para uma correlação positiva com a taxa de

apoptose. Altos níveis de VEGF foram considerados um fator independente para sobrevida global (INVERNINZZI et al., 2017). Essa relação com apoptose desregulada também foi observada por Sun et al. (2006), ao investigar a expressão imuno-histoquímica de Bcl-2 e VEGF em pacientes com SMD *de novo* e pacientes com LMA.

Portanto, a SMD é uma síndrome caracterizada pela insuficiência heterogênea e clonal da MO, que abrange um espectro que varia desde a sua supressão, nos estágios iniciais, até a uma transformação, de alto risco, para leucemia aguda em estágios posteriores. Além do efeito de citocinas inflamatórias no nicho da MO, a depleção de CTHs, a pancitopenia e os blastos leucêmicos também podem contribuir para a alteração da tensão de O₂ na medula e levar à ativação do HIF-1 α . Essa, por sua vez, pode contribuir para a ativação de vias de proliferação que podem ser importantes na transformação da SMD em LMA. Assim, é possível que a hipóxia crônica possa ser crítica para a transformação leucêmica através da ativação de elementos notáveis de resposta à hipóxia (HREs) promovendo proliferação celular, resistência a drogas e, vasculogênese pelo VEGF.

Apesar de alguns trabalhos relacionarem a expressão de fatores angiogênicos do desenvolvimento e progressão da SMD, o papel desses marcadores no prognóstico dessa doença ainda permanece obscuro e poucos trabalhos investigaram a expressão a nível molecular desses marcadores, sendo necessários mais estudos que busquem compreender melhor essa relação, inclusive entre as diferentes classificações dentro do grupo de citopenias e displasia que não fecham os critério para SMD (ICUS, CCUS, CHIP e IDUS). Pesquisas que incorporem essas variáveis são importantes a fim de proporcionar ferramentas mais específicas que direcionem melhor a conduta terapêutica e o *followup* desses pacientes, visto a complexidade e heterogeneidade característica que envolve essa patologia. Diante desse contexto, o presente estudo é de grande relevância ao promover o estudo de fatores de prognóstico nos pacientes e a caracterização do processo de angiogênese, através da expressão gênica e sua relação com a progressão da doença. Dessa maneira, os achados obtidos nesse estudo contribuirão para o avanço no entendimento dos mecanismos fisiopatológico da doença, além de fornecerem subsídios para futuras investigações acerca de novos alvos terapêuticos e implementação de marcadores prognósticos nos serviços de hematologia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a expressão dos genes *TP53*, *VEGFA* E *HIF1 α* em pacientes com Síndrome Mielodisplásica e outras citopenias e associá-los às citocinas VEGF-A, TNF- α , IL-6 e IFN- γ e aos fatores de prognóstico.

2.2 Objetivos Específicos:

- Avaliar os dados demográficos e laboratoriais dos pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.
- Quantificar os níveis plasmáticos de VEGF-A, TNF- α , IL-6 e IFN- γ e compará-los entre os grupos estudados.
- Investigar a expressão dos genes *TP53*, *VEGFA* E *HIF1 α* e compará-las entre os grupos estudados.
- Associar os níveis plasmáticos de VEGF-A, TNF- α , IL-6 e IFN- γ com os fatores de prognóstico níveis de hemoglobina, neutrófilos e plaquetas; número de blastos; fibrose e citogenética;
- Associar expressão gênica do *TP53*, *VEGFA* E *HIF1 α* com os fatores de prognóstico níveis de hemoglobina, neutrófilos e plaquetas; número de blastos; fibrose e citogenética;
- Associar os níveis dos marcadores plasmáticos e a expressão dos genes analisados à sobrevida global;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética Hospital Universitário Walter Cantídio e foi desenvolvido seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob o parecer de número 2.699.561. Todos os participantes receberam as orientações acerca do projeto e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

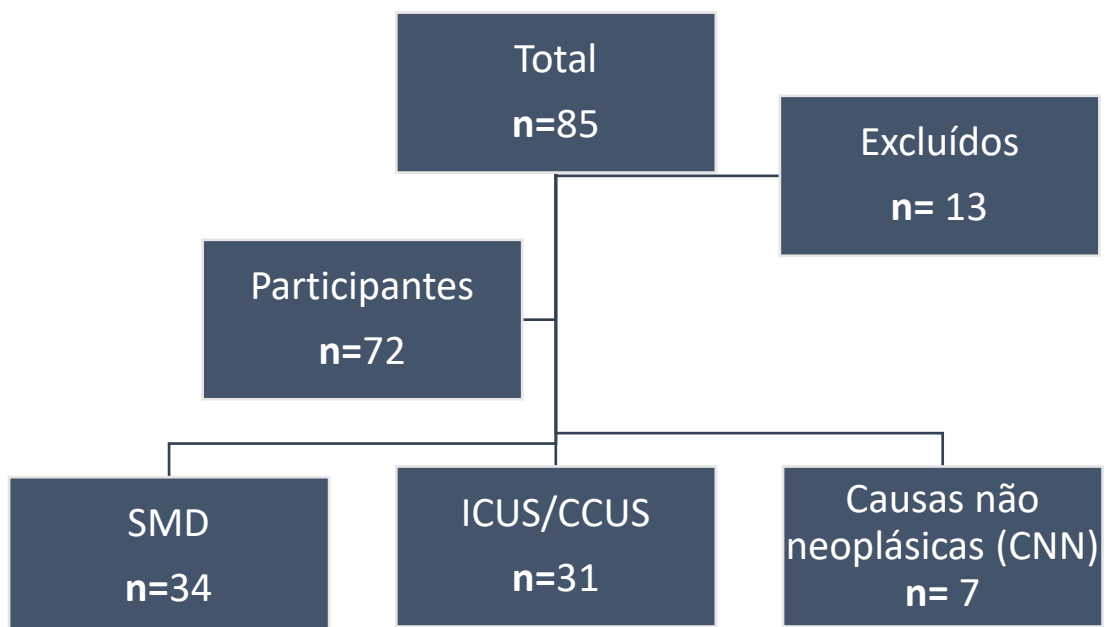
3.2 Local do estudo

O acompanhamento dos pacientes, a coleta de amostras e de dados foram realizados no serviço de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. A quantificação das citocinas foi realizada no Laboratório de Nefrologia e Medicina Tropical da Universidade Federal do Ceará. A expressão dos genes HIF1-alfa e VEGF foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas do curso de Farmácia da UFC.

3.3 Casuística

Foram incluídos inicialmente, 85 pacientes no estudo, conforme fluxograma abaixo.

Figura 5: Fluxograma da distribuição dos pacientes de acordo com critérios de inclusão e exclusão.



3.3.1 Critérios de inclusão:

- 1- Pacientes com diagnóstico de SMD
- 2- Pacientes com citopenias persistentes (duração superior a 6 meses) e/ou com suspeita de SMD, como intuito de obter amostras de pacientes ao diagnóstico.

3.3.2 Critérios de exclusão:

Pacientes com citopenias associadas a outras neoplasias e/ou abandono do seguimento ambulatorial.

3.4 Coleta de dados

Os dados clínicos e laboratoriais, como idade, sexo, classificação da SMD (OMS 2016), estratificação de risco (R-IPSS), transfusões sanguíneas, tratamento, hemograma, mielograma, biópsia de MO e cariótipo foram coletados a partir dos prontuários médicos.

3.5 Coleta de amostras biológicas

Foram colhidas amostras de sangue do aspirado medular com anticoagulante EDTA dos participantes para extração de RNA e quantificação das citocinas. O plasma foi obtido por centrifugação e armazenado a -80°C para determinação dos níveis de VEGF-A, TNF- α , IL-6 e IFN- γ .

3.6 Extração de mRNA

O RNA das amostras foi extraído a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10^6 células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200 μL de Clorofórmio para desproteinização e 10 μL de glicogênio, sendo homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante de cada amostra foi retirado e transferido para novos tubos, seguidos de precipitação com 400 μL de isopropanol, e incubado *overnight* a -20°C . O precipitado foi armazenado a -80°C para posterior extração de DNA e proteínas. Após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase.

A qualidade das amostras foi analisada através de leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras.

3.7 Síntese do cDNA

A partir de 2000 ng de RNA extraído de cada amostra, foi realizada a síntese do cDNA, através do kit para Transcrição Reversa da AppliedBiosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit AppliedBiosystems®), segundo as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído cinco vezes para ser utilizado nas reações de qPCR e armazenado a -20°C.

3.8 Reações de qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

As reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System® (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA), em placas transparentes de 96 poços (MicroAmp 96-well Plates, AppliedBiosystems, Inc., Foster City, CA, USA). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando sondas TaqMan Assay® com marcação FAM-MGB pela AppliedBiosystems (Tabela 6). O volume final de cada reação foi de 10µl, sendo 7µl de TaqMan Universal, 0,5µl de primer (TaqMan Assay) e 2,5µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

Tabela 6: Relação das sondas utilizadas na expressão gênica por qPCR.

Genes analisados	Código de referência (AppliedBiosystems)
Gene normalizador	
<i>GAPDH</i> (Gliceraldeído fosfatodesidrogenase)	Hs99999905_m1
Genes estudados (genes alvos)	
<i>HIF-1 α</i> (Fator Induzido por Hipóxia 1-alfa)	Hs00153153_m1
<i>VEGF-A</i> (Fator de crescimento vascular endotelial A)	HS00900054_m1
<i>TP53</i> (Proteína Tumoral 53)	Hs01034249_m1

3.9 Determinação relativa dos níveis de expressão dos genes alvo

Para normalizar os valores de Cq dos genes alvo (*VEGFA*, *HIF-1α* e *TP53*), o Cq determinado para uma amostra para cada gene foi subtraído do Cq 's dos gene de referência utilizado (*GAPDH*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.10 Determinação dos níveis plasmáticos de VEGF-A, TNF- α , IL-6 e IFN- γ

Os níveis de VEGF-A, TNF- α , IL-6 e IFN- γ foram quantificados por Enzima Imuno ensaio (ELISA), em plasma de medula de acordo com as instruções do fabricante. Kits comerciais de ELISA foram adquiridos da marca R&D Systems® (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). As seguintes etapas foram realizadas:

a) **Sensibilização:** No primeiro dia, foi feita a sensibilização da placa de 96 poços (360 μ L/poço) de poliestireno (UltraCruz® ELISA Plate) com base plana e alta afinidade para ligação de anticorpos. A sensibilização foi feita com a adição de anticorpos primários (100 uL/poço), previamente diluídos em PBS. Após a adição do anticorpo, a placa foi selada e incubada *overnight* à temperatura ambiente sob agitação de 300rpm.

b) **Bloqueio:** No segundo dia, a placa sensibilizada com anticorpo primário foi lavada com solução de lavagem (PBS-Tween 0,1%) por 3 vezes com 300uL/poço, para a retirada de anticorpos que não se ligaram a placa. Depois foi feito o bloqueio da placa com a adição de 300uL/poço da solução Bloqueio (PBS-BSA 1%). A placa foi selada e incubada por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, foi novamente lavada por 3 vezes com 300uL/poço.

c) **Preparo e adição da curva padrão à placa:** cada kit contém o padrão, proteína recombinante do biomarcador humano, em uma concentração conhecida após a reconstituição com a solução diluente (PBS-BSA 1%). A partir do padrão reconstituído é feita a curva padrão para análise dos resultados. Para isso, foi feita a diluição seriada do padrão, totalizando 7 diluições ou 7 pontos da curva padrão (curva linear).

d) **Adição das amostras biológicas:** as amostras de plasma dos pacientes foram separadas e descongeladas a temperatura ambiente, submetidas ao vortex e depois centrifugadas. Foram adicionados 100 μ L de amostra e padrão. As placas foram então seladas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação de 300 rpm. Nova lavagem foi feita para a retirada de não-ligantes.

e) **Adição e ligação do anticorpo secundário (conjugado a biotina):** nessa etapa, 100 μ L de anticorpo específico para epítomos do biomarcador fixado no anticorpo primário foram adicionado. As placas foram então seladas e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação de 300 rpm. Nova lavagem foi feita para a retirada de anticorpos não-ligantes

f) **Adição e ligação da estreptavidina-HRP:** A estreptavidina ligada a enzima peroxidase (100 μ L) foi adicionada na placa para ligação com a biotina. As placas foram então

seladas e incubadas por 20 minutos a temperatura ambiente sob agitação de 300 rpm ao abrigo da luz. Nova lavagem foi feita para a retirada de não-ligantes.

g) **Quantificação do complexo imobilizado (Anticorpo primário-Biomarcador-Anticorpo secundário –biotina-estreptavidina-peroxidase):** nessa etapa foi feito o monitoramento da atividade da peroxidase na presença de um substrato cromógeno, 3',5,5'-tetra-metilbenzidina (*TMB ELISA substrate-High Sensitivity*, Abcam®). Após a adição do TMB (100 uL/poço), a placa foi incubada por 20 minutos no escuro, sendo observado o desenvolvimento da cor azulada, representando a concentração de biomarcador na amostra.

h) **Parada da reação do TMB:** a reação foi parada com a adição de 50µL de ácido sulfúrico a 2 Normal (100 uL/poço), produzindo uma cor amarelada.

A intensidade da cor gerada foi medida usando um espectrofotômetro a 450 nm, com filtro de 570 nm. O aumento da absorbância é diretamente proporcional a concentração do biomarcador na amostra.

3.11 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio dos programas GraphPadPrism 6.0 e SPSS 24.0. O teste Shapiro-Wilk foi empregado para avaliar a normalidade dos dados. Valores de *outliers* foram removidos. Foram considerados com distribuição normal (dados paramétricos) os grupos com p-valor >0,05 para o teste de Shapiro-Wilk.

Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA one-way, para a comparação das médias com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA one-way foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor $\geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA one-way o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p-valor <0,05), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

Os níveis de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta C_q}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes e as variáveis analisadas. O nível de significância estatística utilizado foi de p<0,05. As análises de sobrevivência foram realizadas com o auxílio do *software* online gratuito *CutoffFinder* (<http://molpath.charite.de/cutoff/>) para obtenção das diferenças entre as curvas de sobrevivência pelo teste de *LogRank*.

4. RESULTADOS

4.1 Análise clínica e laboratorial dos pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.

Um total de 85 pacientes encaminhados ao serviço de hematologia do HUWC para realização do mielograma por citopenia a esclarecer, macrocitose e SMD, foram incluídos no estudo. Desses, 13 foram diagnosticados com outra patologia neoplásica ou não deram continuidade à investigação, sendo excluídos. O número de pacientes com citopenias não associadas a causas neoplásicas (CNN) foi 7 (doenças genéticas (n=2), doença de Gaucher (n=2), multifatorial (n=1), associadas a alterações renais (n=2)). Dentre os 65 restantes, 31 pacientes apresentavam citopenias persistentes sem uma causa definida após investigação clínica e laboratorial, e não preencheram os critérios para SMD, sendo classificados como ICUS/CCUS (VALENT 2018). O número de pacientes com SMD foi 34, sendo 22 com diagnóstico prévio e 12 com diagnóstico confirmado após a data da coleta.

A média de idade dos pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN foi respectivamente 74, 61 e 50. Apenas no grupo SMD a frequência entre os sexos foi a mesma. Nos demais, houve um predomínio do sexo feminino (Tabela 7).

Quando o grupo SMD foi estratificado de acordo com a fase da doença, observaram-se maiores níveis de hemoglobina, neutrófilos e plaquetas na fase inicial da doença e um menor número de blastos (Tabela 8).

Tabela 7: Análise clínica e laboratorial dos pacientes.

	Grupos						P Valor
	SMD		ICUS/CCUS		CNN		
	Média (Faixa)	n(%)	Média (Faixa)	n(%)	Média (Faixa)	n (%)	
Sexo							
F		17 (50%)	21	67,7%	5	71,4%	0,278
M		17 (50%)	10	32,3%	2	28,6%	
Idade	74 (47 – 94)	34	61 (20 – 92)	31	50 (24 – 82)	7	0,002
Estratificação por idade							
<60		7 (20,6%)		12 (38,7%)		4 (57,1%)	0,129
≥60		27 (79,4%)		19 (61,3%)		3 (42,9%)	
Hemácias	3,63 (1,70 – 6,40)	34	3,89 (1,70 – 6,50)	31	4,00 (2,80 – 5,60)	7	0,562
Hemoglobina	10,97 (5,7 – 15,40)	34	11,32 (9,5,8 – 16,0)	31	13,02 (9 – 17,3)	7	0,257
Estratificação de Hb							
>10		24(70,6%)		22 (71,0%)		6 (85,7%)	0,895
8 – 10		4(11,8%)		5 (16,1%)		1 (14,3%)	
<8		6 (17,6%)		4 (12,9%)		0 (0,0%)	
Monócitos	715,91 (140 – 2755)	34	433,88 (125 – 776)	31	512,4 (165 – 878)	7	0,302
Hematócrito	33,64 (17,50 – 48,00)	34	34,65 (16,7-49,1)	31	39,6 (26,6-56,4)	7	0,284
VCM	94,27 (59,70 – 114,30)	34	90,54 (70,1 –111)	31	98,78 (93,8 – 109,5)	7	0,253
Neutrófilos	2677,43 (391 – 12302)	34	3307,26 (804 – 9976)	31	2666,2 (1279 – 3506)	7	0,470
Estratificação de neutrófilos							
>800		31 (91,2%)		29 (93,5%)		7 (100,0%)	0,747
≤800		3 (8,8%)		2 (6,5%)		0 (0,0%)	
Plaquetas	148728,75 (14000 – 986100)	34	128505,48 (13710 – 528000)		125886,00 (37810 –285100)		0,642
Estratificação de plaquetas	19						
≥100		16 (47,0%)		18 (58,1%)		3 (42,8%)	0,809
100-50		9 26,5%		8 (25,8%)		1 (14,4%)	

≤50		9 (26,5%)		5 (16,1%)		3(42,8%)	
Celularidade do mielograma							
Hipocelular		5 (14,7%)		10 (32,3%)		1(14,2%)	0,309
Normocelular		2 (5,8%)		2 (6,5%)		0 (0,0%)	
Hiper celular		27 (79,4%)		19 (61,3%)		6 (85,8%)	
Diseritropoese							
Ausência		6 (17,6%)		15 (48,4%)		1 (14,3%)	0,001
<10		9 (26,5%)		15 (48,4%)		6 (85,7%)	
≥10		19 (55,9%)		1 (3,2%)		0 (0,0%)	
Disgranulopoese							
Ausência		12 (35,3%)		14 (45,2%)		7 (100,0%)	0,017
<10		13 (38,2%)		16 (51,6%)		0 (0,0%)	
≥10		9 (26,5%)		1 (3,2%)		0 (0,0%)	
Dismegacariopoese							
Ausência		12(35,3%)		17 (54,8%)		4 (57,1%)	0,051
<10		8 (23,5%)		11 (35,5%)		3 (42,9%)	
≥10		14 (41,2%)		3 (9,7%)		0 (0,0%)	
Percentual de Blastos	5,52 (0 – 8)	34	1,61 (0 – 4)	31		7	0,228
*Coloração de Pearls							
Ausente ou diminuído		16(47,2%)		12 (41,4%)		3 (50,0%)	0,018
Presente ou normal		7(20,6%)		15 (51,7%)		3 (50,0%)	
Aumentado		11(32,3%)		2 (6,8%)		0 (0,0%)	
Celularidade da BMO							
Hipocelular		6 (27,3%)		5 (29,4,%)		3 (100,0%)	
Normocelular		4 (18,2%)		2 (11,8%)		0 (0,0%)	
Hiper celular		12 (54,5%)		10 (58,8%)		0 (0,0%)	
Mielofibrose (Grau/Disposição)							
Ausência		12 (54,5%)		12 (80,0%)		N/A	0,358
Presença		10 (45,5%)		3 (20,0%)			
Cariótipo							
Normal		10 (58,8%)		6 (85,7%)		1 (100,0%)	0,343
Alterado		7 (41,2%)		1 (14,3%)		0,0%	
Dependência transfusional							
Não dependente		30 (88,2%)		29 (93,5%)		7 (100,0%)	0,597
Dependente		4 (11,7%)		2 (6,4%)		0 (0,0%)	
OMS							

SMD DUL	10 (29,4%)	NA	NA	
SMD DML	10 (29,4%)	NA	NA	
SMD DUL	2 (5,8%)			
SMD SA DML	2 (5,8%)	NA	NA	
SMD del (5q)	2 (5,8%)	NA	NA	
SMD relacionada a terapia	3(8,8%)	NA	NA	
AREB	5(15,0%)	NA	NA	
R-IPSS				
Muito baixo/Baixo	10 (58,9%)	NA	NA	
Intermediário	6 (35,3%)	NA	NA	
Alto/muito alto	1 (5,8%)	NA	NA	
Óbito				
Não	31 (91,2%)	31 (100,0%)	7 (100,0%)	0,174
Sim	3 (8,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

OMS: Organização Mundial de Saúde; DUL- Displasia em única linhagem; DML: displasia em múltipla linhagem; SA DML: Sideroblasto em anel com displasia em múltipla linhagem; SMD del (5q): deleção do braço longo do cromossomo 5; AREB: Anemia refratária com sideroblastos em anel; R-IPSS: Sistema de Scores Prognósticos Revisado; NA: não aplicado. *: em alguns mielogramas a coloração de PERLS foi prejudicada, não sendo possível a avaliação.

Tabela 8: Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com SMD de acordo com o estágio da doença.

	Estratificação da SMD				P Valor
	Formas Iniciais n=26		Formas avançadas n=5		
	Média	N e/ou (%)	Média	N e/ou (%)	
Sexo					
F		16 (61,5%)		1 (20,0%)	0,082
M		10 (38,5%)		4 (80,0%)	
Idade	72 (24 – 96)		74 (54 – 93)		0,955
Estratificação por idade					
<60		5 (19,2%)		2(40,0%)	0,362
≥60		21 (80,8%)		3 (60,0%)	
Hemácias	3,89 (2,27 – 6,40)	26	3,64 (2,70 – 4,90)	5	0,610
Hemoglobina	11,83 (6,40 – 15,40)	26	9,26 (7,10 – 12,60)	5	0,786
Estratificação de Hb					
>10		21 (80,8%)		1 (20,0%)	0,006
8 – 10		3 (11,5%)		2 (40,0%)	
<8		2 (7,7%)		2 (40,0%)	
Monócitos	609,40 (140 – 1864)	26	802,33 (393 – 1090)	5	0,0028
Hematócrito	36,12 (24,7 – 48)	26	28,90 (22,3 – 38,2)	5	0,950
VCM	94,10 (75 – 113)	26	89,22 (59,7 – 114,3)	5	0,441
Neutrófilo	2740,27 (947 – 12302)	26	1763,25 (391 – 3360)	5	0,033
Estratificação de neutrófilos					
>800		26 (100,0%)		3 (60,0%)	0,001
≤800		0 (0,0%)		2 (40,0%)	
Plaquetas (x10³)	166,5 (17,8 – 986,1)	26	80,2 (4,0 – 132,3)	5	0,016
Estratificação de					

plaquetas				
≥100	16 (61,5%)		2 (40,0%)	0,645
100 – 50	6 (23,1%)		2 (40,0%)	
≤50	4 (15,4%)		1 (20,0%)	
Celularidade do mielograma				
Hipo celular	5 (19,2%)		0 (0,0%)	0,492
Normocelular	2 (7,6%)		0 (0,0%)	
Hiper celular	19 (73,1%)		5 (100,0%)	
Diseritropoese				
Ausência	4 (15,3%)		2 (25,0%)	0,391
<10	8(30,7%)		0 (0,0%)	
≥10	14 (53,8%)		3 (75,0%)	
Disgranulopoese				
Ausência	9 (34,6%)		0 (0,0%)	0,391
<10	10 (38,4%)		3 (60,0%)	
≥10	7 (27,0%)		2 (40,0%)	
Dismegacariopoese				
Ausência	10 (38,5%)		2 (40,0%)	0,141
<10	6(23,0%)		2 (40,0%)	
≥10	10 (28,5%)		1 (20,0%)	
Percentual de Blastos	1,41 (0 – 3)			
Coloração de Pearls	26	6,40 (5 – 8)	5	0,003
Ausente ou diminuído	13 (50,0%)		2 (40,0%)	0,788
Presente ou normal	4 (16,7%)		1 (20,0%)	
Aumentado	9 (33,3%)		2 (40,0%)	
Celularidade da BMO				
Hipo celular	5 (29,4%)		0 (0,0%)	0,437
Normocelular	4 (23,5%)		0 (0,0%)	
Hiper celular	8 (47,1%)		2 (100,0%)	
Mielofibrose (Grau/Disposição)				
Ausência	9(60,0%)		0 (0,0%)	0,058
Presença	6 (40,6%)		2 (100,0%)	
Cariótipo				
Normal	6 (60,0%)		3 (75,0%)	
Alterado	4 (40,0%)		1 (25,0%)	
OMS				
SMD DUL	10		0	**

SMD DML	10	0	
SMD SA DML	2	0	
SMD del (5q)	2	0	
SMD relacionada a terapia	0	0	
AREB	0	5	
SMD-SA-DUL	2		
RIPSS			
Muito baixo/Baixo	9	0	0,006
Intermediário	1	3	
Alto/muito alto	0	1	
Dependência transfusional			
Não dependente	25 (96,2%)	4 (80,0%)	0,301
Dependente	1 (3,8%)	1 (20,0%)	
Óbito			
Não	26 (100,0%)	3 (60,0%)	0,02
Sim	0 (0,0%)	2 (40,0%)	

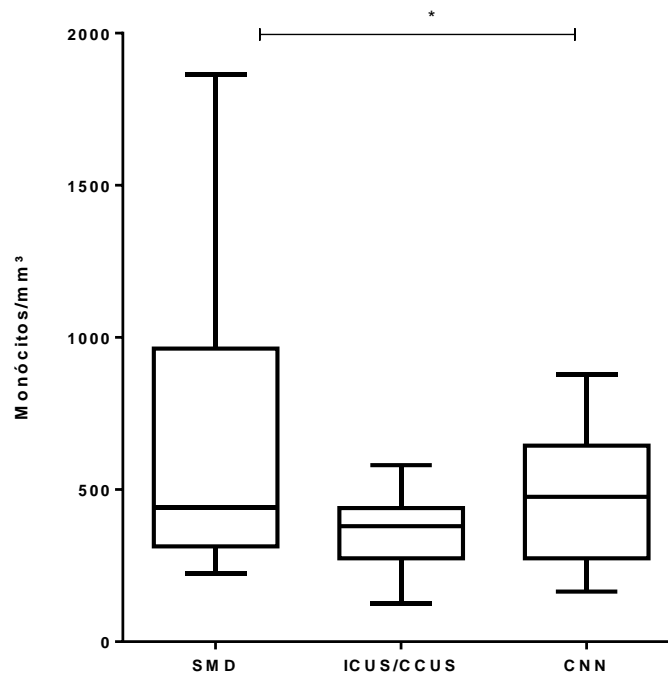
Dentre os pacientes com SMD com resultado de cariótipo (n=17), 10 (58,8%) eram normais e 7 (42,2%) alterados. Em 2 casos, houve ausência de metáfase. No grupo ICUS/CCUS, o cariótipo foi obtido em 7 (23,3%) pacientes, dos quais 6 (85,7%) eram normais e 1(14,3%) alterado, apresentando a monossomia do cromossomo Y. A tabela 9 apresenta as principais características epidemiológicas e laboratoriais dos pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.

Tabela 9: Alterações citogenéticas dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica e ICUS/CCUS

Alterações citogenéticas no grupo SMD	N
46, XX[15]/ 46,XX, del (5)(q13.1)[5]	1
46,XX,+ 6[3]/46,XX[17]	1
47,XY+8 [8]; 46,XY[12]	1
46,XY[13]/46,del(11)(q23)[7]	1
175,XXXXXXXX,-5,-6,-7,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX, del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]	1
45,XX,-18[4]/46,xx[16]	1
Alterações citogenéticas no grupo ICUS/CCUS	N
45, X, -Y [6]/ 46, XY[14]	1

A análise dos parâmetros hematológicos mostrou um perfil semelhante nos três grupos quanto aos parâmetros do hemograma. Entretanto, foi observado um aumento no número de monócitos no grupo SMD comparado ao grupo ICUS/CCUS (Gráfico 1).

Gráfico 1: Contagem de monócitos em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.



ANOVA * $p < 0,005$

4.2 Caracterização da interação dos genes *TP53*, *HIF1 α* e *VEGFA* e citocinas imunomoduladoras *IFN γ* , *TNF α* e *IL-6* na fisiopatologia de pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN com base em análise de correlação.

Os níveis de correlação entre os genes co-expressos foram avaliados nos grupos de pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN. Inicialmente, a análise de correlação em todos os pacientes analisados revelou uma forte correlação positiva entre a expressão do genes *VEGFA* e *HIF1 α* ($R=0,834$; $p < 0,001$), e correlação positiva moderada entre a expressão dos genes *HIF1 α* e *TP53* ($R=0,595$; $p < 0,001$) e *VEGFA* e *TP53* ($R=0,551$; $p < 0,001$). Nesse cenário também ocorreu a correlção positiva entre a expressão do gene *HIF1 α* e a citocina *IFN γ* ($R=0,628$, $p < 0,001$) e a citocina *VEGFA* ($R=0,502$, $p < 0,001$).

A correlação positiva entre esses biomarcadores demonstra que estes atuam junto na fisiopatologia das doenças estudadas (Tabela 10).

Ademais, avaliou-se a interação entre os genes e as citocinas estudadas, somente em pacientes em SMD, e observou-se de correlação entre a expressão dos genes VEGFA e HIF1 α (R=0,685, p<0,001) (Tabela 11).

Tabela 10: Matriz de correlação da expressão dos genes *TP53*, *VEGF* e *HIF* e as citocinas TNF, IFN, VEGF e IL6 em paciente com *SMD*, *ICUS/CCUS* e *CNN*

		mRNA <i>TP53</i>	mRNA <i>HIF1α</i>	mRNA <i>VEGFA</i>	IFN γ (pg/mL)	TNF α pg/ mL	VEGFA pg/mL	IL-6 pg/mL
mRNATP53	Coeficiente de Pearson	1	,595**	,551**	,195	-,285	,170	-,077
	p valor		,000	,000	,215	,120	,396	,692
mRNA <i>HIF1α</i>	Coeficiente de Pearson	,595**	1	,834**	,628**	-,102	,502**	-,020
	p valor	,000		,000	,000	,578	,006	,917
mRNA <i>VEGFA</i>	Coeficiente de Pearson	,551**	,834**	1	,387**	,022	,331	-,083
	p valor	,000	,000		,007	,900	,065	,642
IFN γ (pg/mL)	Coeficiente de Pearson	,195	,628**	,387**	1	,062	,383*	,037
	p valor	,215	,000	,007		,694	,018	,819
TNF α pg/MI	Coeficiente de Pearson	-,285	-,102	,022	,062	1	,025	,111
	p valor	,120	,578	,900	,694		,875	,471
VEGF Apg/mL	Coeficiente de Pearson	,170	,502**	,331	,383*	,025	1	,215
	p valor	,396	,006	,065	,018	,875		,189
IL-6 pg/mL	Coeficiente de Pearson	-,077	-,020	-,083	,037	,111	,215	1
	p valor	,692	,917	,642	,819	,471	,189	

** . Correlação é significativa ao nível de p= 0.01.

* . Correlação é significativa ao nível de p=0.05.

Tabela 11: Matriz de correlação da expressão dos genes *TP53*, *VEGF* e *HIF* e as citocinas TNF, IFN, VEGF e IL6 em paciente com SMD.

		mRNA <i>TP53</i>	mRNA <i>HIF1α</i>	mRNA <i>VEGFA</i>	IFN γ pg/mL	TNF α pg/mL	VEGFA pg/mL	IL-6 pg/mL
mRNA_ <i>TP53</i>	Coeficiente de Pearson	1	-,047	,346	,256	,187	-,371	-,164
	p valor		,847	,106	,228	,560	,292	,611
mRNA_ <i>HIF1α</i>	Coeficiente de Pearson	-,047	1	,684**	-,098	-,219	-,365	-,161
	p valor	,847		,000	,650	,493	,334	,598
mRNA_ <i>VEGFA</i>	Coeficiente de Pearson	,346	,684**	1	-,234	-,036	-,406	-,196
	p valor	,106	,000		,222	,899	,190	,484
IFN γ pg/mL	Coeficiente de Pearson	,256	-,098	-,234	1	,166	-,033	-,021
	p valor	,228	,650	,222		,524	,911	,937
TNF α pg/mL	Coeficiente de Pearson	,187	-,219	-,036	,166	1	-,248	,167
	p valor	,560	,493	,899	,524		,415	,536
VEGFA pg/mL	Coeficiente de Pearson	-,371	-,365	-,406	-,033	-,248	1	-,175
	p valor	,292	,334	,190	,911	,415		,568
IL-6 pg/mL	Coeficiente de Pearson	-,164	-,161	-,196	-,021	,167	-,175	1
	p valor	,611	,598	,484	,937	,536	,568	

** . Correlação é significativa ao nível de $p=0.01$.

* . Correlação é significativa ao nível de $p=0.05$.

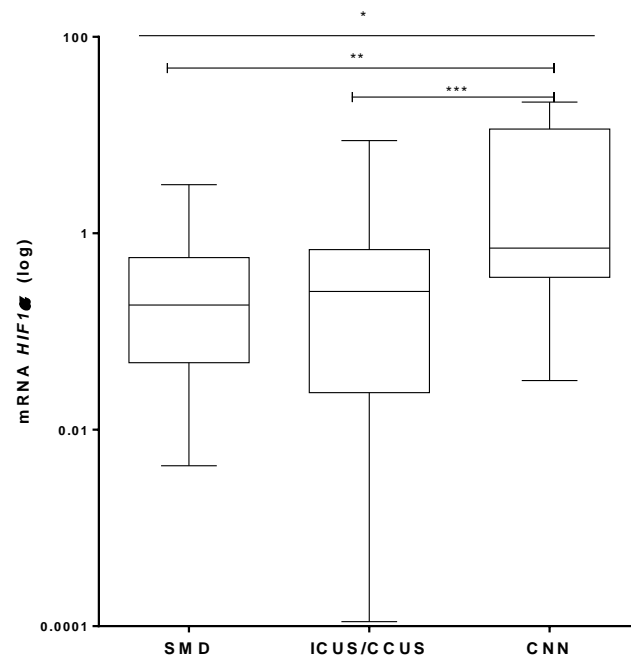
4.3 Análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* e *VEGFA* e das citocinas IFN γ , TNF α , VEGFA e IL-6 como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.

Quanto à expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* e *VEGFA*, não foi observada diferença entre os grupos SMD e ICUS/CCUS. Porém, quando se comparou com o grupo CNN, este apresentou aumento significativo da expressão do gene *HIF1 α* em comparação ao grupo SMD e ICUS/CCUS. Em relação à citocina IFN γ , o grupo CNN também apresentou níveis elevados quando comparados aos demais grupos. Não houve diferença estatística entre o grupo SMD e ICUS/CCUS. Os níveis de IL-6 não foram significativamente diferentes entre os grupos, entretanto, observou-se uma tendência de aumento no grupo CNN em relação aos demais grupos (Tabela 12).

Tabela 12: Análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* e *VEGFA* e das citocinas IFN- γ , TNF- α , VEGFA e IL-6 em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.

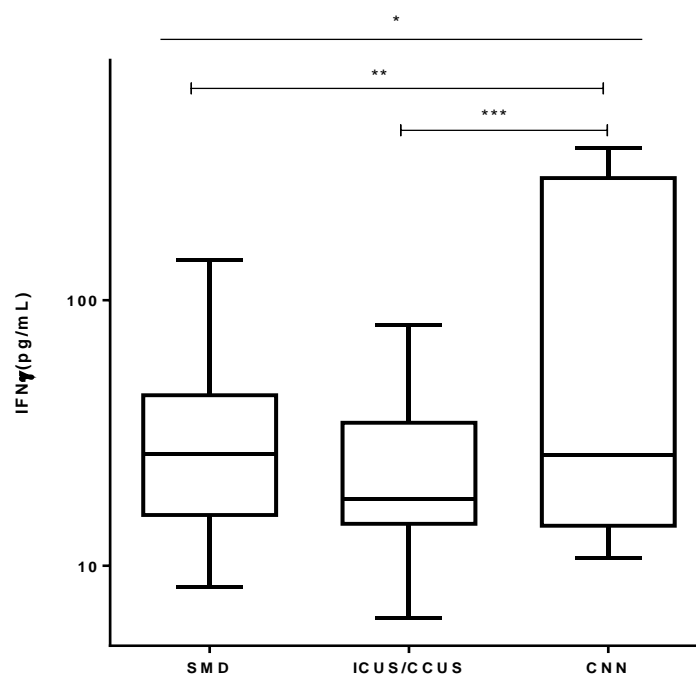
	SMD (n=32)			ICUS/CCUS (n=29)			CNN (n=5)			<i>p</i> Valor
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	
mRNA$TP53$	4,456	,340	26,358	5,845	,181	36,424	5,754	,868	15,552	0,796
mRNA$HIF1\alpha$,537	,004	3,133	,879	,009	8,785	4,891	,031	21,689	0,019
mRNA$VEGFA$	8,943	,089	31,125	6,494	,001	33,142	17,529	,429	60,987	0,111
IFN-γ (pg/mL)	32,864	8,350	141,800	37,943	6,386	312,100	111,651	10,708	375,030	0,017
TNF-α (pg/mL)	3,207	1,812	5,584	2,817	1,521	5,645	2,958	1,521	3,938	0,346
VEGFA (pg/mL)	13,619	3,599	38,034	15,216	,396	36,032	23,569	4,002	62,859	0,334
IL-6 (pg/mL)	7,058	3,358	12,257	5,809	3,198	10,790	8,395	3,762	15,531	0,063

Gráfico 2: Expressão do mRNA do gene *HIF1 α* em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN.



*Teste de anova $p=0,019$; ** Pós-teste Turkey HSD $p=0,015$ demonstrando a diferença entre o grupo SMD e citopenias; *** Pós-teste Turkey HSD $p=0,019$, demonstrando diferença entre o grupo ICUS/CCUS e citopenias.

Gráfico 3: Níveis de IFN γ em pacientes com SMD, ICUS/CCUS e CNN



4.3.1 Análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* e *VEGFA* e das citocinas *IFN γ* , *TNF α* e *IL-6* como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD.

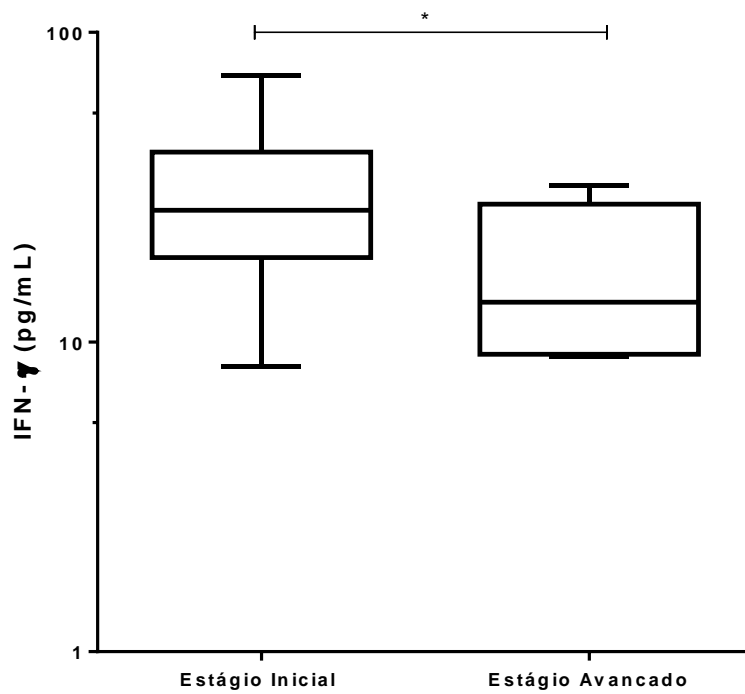
Os pacientes com SMD foram estratificados de acordo com o estágio da doença, caracterizado pela proliferação de células imaturas na medula. Os pacientes classificados com doença inicial compreenderam as categorias de SMD com displasia em única e múltiplas linhagens, SMD com sideroblastos em anel e SMD com del 5q. A forma avançada incluiu o pacientes classificados com SMD com excesso de blastos. O perfil da expressão gênica foi semelhante nos dois grupos. Porém o perfil das citocinas mostrou uma diferença significativa para os níveis de TNF α e IFN γ (Tabela 13). As SMDs secundárias (n=3) não foram incluídas nessa análise.

Tabela 13: Análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF α* , *VEGF* e das citocinas IFN, TNF e IL-6 como marcadores imunomoduladores em pacientes com SMD.

	Formas Iniciais n=24			Formas avançadas n=5			<i>p</i> Valor
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	
mRNA TP53	2,910	,340	7,057	4,474	,418	9,366	0,259
mRNA HIF	,463	,003	3,133	,332	,096	,697	0,661
mRNA VEGF	7,760	,078	31,125	7,783	,403	15,678	0,988
IFN- γ (pg/mL)	28,366	8,350	49,293	15,973	8,979	32,162	0,045
VEGF (pg/mL)	25,047	5,640	79,675	13,528	5,640	25,221	0,063
IL-6 (pg/mL)	6,302	3,358	10,881	7,289	3,358	12,257	0,197
TNF- α (pg/mL)	2,692	1,812	3,633	3,991	2,581	5,584	0,003

Os pacientes com SMD no estágio inicial apresentaram maiores níveis de IFN γ quando comparados a pacientes com SMD avançada (Gráfico 4).

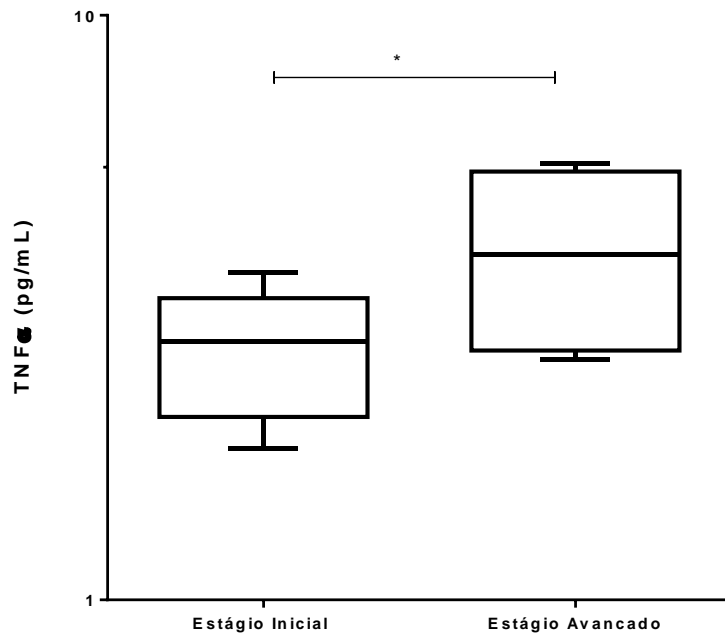
Gráfico 4: Níveis de IFN- γ em pacientes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com o estágio da doença.



Teste T de Student. Valor de $p=0.045$

Em relação aos níveis de $TNF\alpha$, observou-se um comportamento contrário ao do $IFN\gamma$, onde maiores níveis de $TNF\alpha$ foram detectados nos pacientes com SMD avançada. (Gráfico 5).

Gráfico 5: Níveis de $TNF\alpha$ em pacientes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com as formas da doença.



Teste T de Student. Valor de $p=0.032$

4.4 Influência da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas *IFN γ* , *TNF α* , *VEGFA* e *IL-6* nas citopenias periféricas.

Foi analisada a associação entre a expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e citocinas *IFN γ* , *TNF α* , *VEGFA* e *IL-6* e as citopenias periféricas, representadas pelos níveis de hemoglobina, neutrófilos e plaquetas.

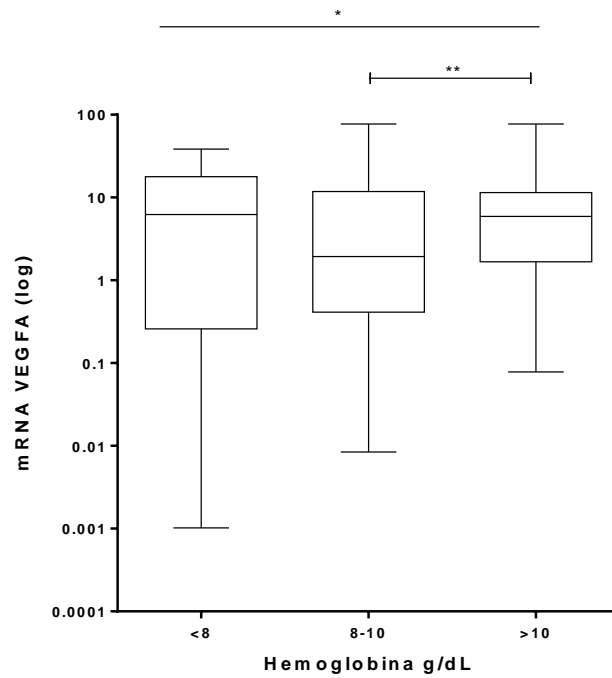
Hemoglobina

Para análise da expressão dos genes de angiogênese e citocinas de acordo com os níveis de hemoglobina, os pacientes foram divididos em três grupos de acordo com os critério do R-IPSS ($Hb > 8g/dL$, $Hb 10-8g/dL$ e $Hb \leq 8g/dL$). Houve uma expressão maior de *mRNA VEGFA* no grupo com níveis de hemoglobina entre 8-10g/dL (Tabela 15).

Tabela 14: Influência da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas *IFN γ* , *TNF α* , *VEGFA* e *IL-6* nos níveis de hemoglobina estabelecidos pelos R-IPSS.

	Hemoglobina (g/dL)									<i>p</i> Valor
	>10 N=48			8 – 10 N=9			<8 N=9			
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	
mRNA <i>TP53</i>	4,598	,181	36,424	1,689	1,437	2,102	3,954	,285	9,366	0,785
mRNA <i>HIF1α</i>	,800	,002	8,785	,3546	,007	,984	,884	,001	2,754	0,731
mRNA <i>VEGFA</i>	7,562	,078	33,142	3,812	,008	12,00	10,458	,001	38,372	0,038
IFN-γ (pg/mL)	32,709	4,107	312,10	16,877	9,293	30,040	24,968	12,201	46,621	0,557
TNF-α (pg/mL)	3,031	1,521	5,645	2,826	1,721	3,415	3,278	1,653	5,584	0,767
VEGF (pg/mL)	15,728	,396	39,235	12,663	,797	27,623	19,188	3,599	79,675	0,692
IL-6 (pg/mL)	6,471	3,198	11,980	5,022	4,334	5,844	5,894	3,843	8,542	0,212

Gráfico 6: Expressão do mRNA do gene *VEGFA* de acordo com os níveis de hemoglobina estabelecidos pelo R-IPSS, nos grupos SMD, ICUS/CCUS e CNN.



*ANOVA:p=0.038; **Teste de Tukey: p=0.024

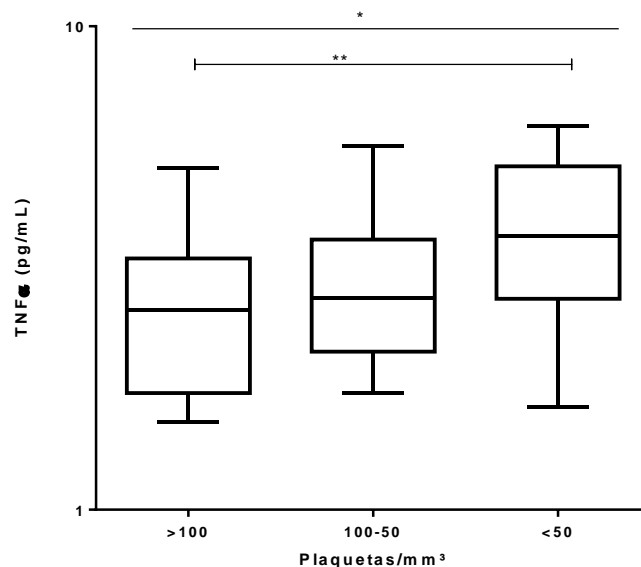
Plaquetas

A análise da expressão gênica e das citocinas sobre as plaquetas mostrou que o nível de TNF α no plasma de pacientes com um número de plaqueta menor que 50/mm³ é maior do que em pacientes com plaquetas entre 50 e 100/mm³ (Tabela 15).

Tabela 15: Influência da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, $VEGFA$ e $IL-6$ nos níveis de plaquetas estabelecidos pelos R-IPSS.

	Plaquetas/mm ³									P
	≥100 (n=33)			100 – 50 (n= 17)			≤50 (n=16)			
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínio	Máximo	
mRNA TP53	5,639	,285	33,742	4,939	,181	26,603	8,212	,418	36,424	0,55
mRNA HIF1α	50,354	,001	1572,33	,349	,002	2,754	1,744	,041	8,785	0,63
mRNA VEGF	10,747	,001	84,987	5,770	,078	32,799	35,960	,403	342,857	0,16
IFN-γ (pg/mL)	31,999	6,071	152,633	21,75	9,293	41,100	58,15	4,107	504,580	0,46
TNF-α (pg/mL)	2,687	1,521	5,098	3,023	1,743	5,645	3,874	1,631	6,206	0,01
VEGFA (pg/mL)	23,509	,396	85,681	17,35	6,002	39,235	11,09	,797	28,024	0,13
IL-6 (pg/mL)	7,028	3,198	18,206	6,269	3,358	10,881	7,657	3,519	14,681	0,55

Gráfico 7: Níveis da citocina plasmática $TNF\alpha$ entre pacientes com SMD, ICUS e CNN de acordo com a contagem de plaquetas estabelecida pelos R-IPSS.



*Anova: p=0,012; **Teste Tukey: p=0,008

Para avaliar a associação dos níveis de TNF α de acordo com as classes de plaquetas estabelecidas pelo R-IPSS e sua diferença entre os grupos de pacientes analisados (SMD, ICUS e citopenias), realizamos uma análise co-variança e uma análise de anova de duas vias.

A análise de co-variança revelou que não existe influência dos grupos de pacientes sobre a associação entre os níveis de TNF α e a classe de plaquetas ($p=0,792$). A análise de anova de duas vias também não revelou diferenças entre a associação dos níveis de TNF α e classes de plaquetas nos diferentes grupos de pacientes ($p=0,104$; $F=2,094$). Esse achado pode sugerir que os níveis de TNF α são variáveis entre pacientes com plaquetopenia severa indiferentemente do tipo da causa da citopenia (neoplásica, pré-neoplásica ou não neoplásica).

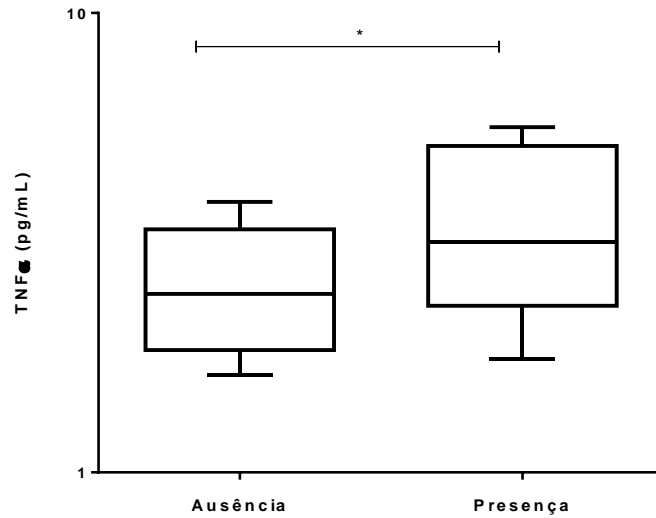
4.5 Expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas IFN γ , TNF α , VEGFA e IL-6 de acordo com a fibrose

Quanto à fibrose, os pacientes foram estratificados da seguinte forma: ausência (MF0) e presença (MF1 e MF2). A análise da expressão gênica e das citocinas mostrou níveis aumentados de TNF α e IL-6 em pacientes com mielofibrose (Tabela 17 e Gráfico 8)

Tabela 16: Análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas IFN γ , TNF α e IL-6 em relação à mielofibrose.

	Mielofibrose (Grau/Disposição)						<i>P</i> Valor
	Ausência (n =23)			Presença (n =13)			
	Média	Mínimo	Máximo	Média	Mínimo	Máximo	
mRNA TP53	4,881	,181	36,424	5,051	,407	15,188	0,943
mRNA HIF1α	,186	,008	,719	,187	,096	,344	0,988
mRNA VEGFA	9,533	,001	32,799	9,814	,089	48,946	0,943
IFN-γ (pg/mL)	29,092	8,350	152,633	31,705	10,786	53,460	0,783
TNF-α (pg/mL)	2,605	1,631	3,882	3,583	1,766	5,645	0,031
VEGFA (pg/mL)	18,424	5,640	63,259	18,114	3,599	38,034	0,960
IL-6 (pg/mL)	5,237	3,358	18,206	8,211	3,519	10,88171	0,001

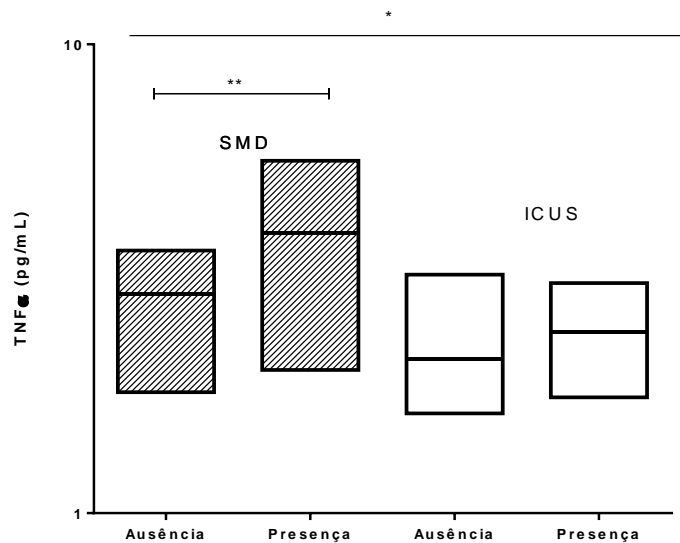
Gráfico 8: Níveis da citocina TNF α de acordo a presença e ausência da mielofibrose.



*Teste T: $p < 0,005$

Para análise de co-variança avaliamos que existe influência dos grupos de pacientes sobre a associação dos TNF α de acordo com $p=0.025$. Quando estratificados de acordo com a doença, os pacientes com SDM e fibrose apresentaram maiores níveis de TNF α (Gráfico 9).

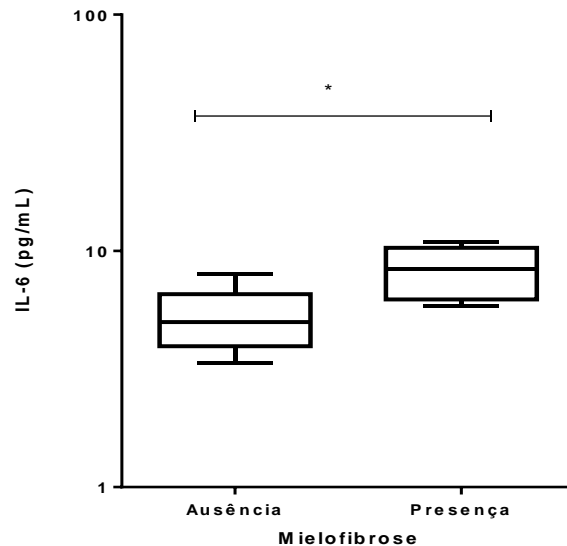
Gráfico 9: Níveis da citocina TNF α de acordo a presença e ausência da mielofibrose, em pacientes dos grupos SMD e ICUS/CCUS.



*Teste T: $p < 0,005$

Os pacientes com CNN não foram incluídos porque não existiam pacientes com a expressão do $TNF\alpha$ e os dados de fibrose, já que a biópsia de medula não foi realizada na maioria dos pacientes desse grupo. A IL-6 também mostrou-se aumentada nos pacientes com mielofibrose, conforme é apresentado no gráfico 10.

Gráfico 10: Níveis da citocina IL-6 de acordo a presença e ausência da mielofibrose.



Apesar de os níveis de IL-6 terem sido influenciados pela presença de fibrose, não houve diferença significativa quanto aos grupos SMD e ICUS/CCUS.

4.6 Análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, *VEGFA* e IL-6 de acordo com o cariótipo, celularidade da BMO e dispoese.

A análise da expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , *VEGFA* e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$ entre pacientes com cariótipo normal e alterado; medula hipocelular versus medula normo/hipercelular não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos.

4.7 Análise de sobrevida global dos pacientes de acordo com a expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , e *VEGFA* e das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, *VEGFA* e IL-6

A expressão dos genes *TP53*, *HIF1 α* , e *VEGFA* e os níveis das citocinas $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, *VEGFA* e IL-6 não apresentou impacto na sobrevida dos pacientes do estudo.

5 DISCUSSÃO

Síndrome Mielodisplásica é um termo usado para um conjunto de doenças clonais, caracterizadas por citopenias periféricas, displasia em uma ou mais linhagens da medula óssea e instabilidade genética (GIAGOUNIDIS; HAASE, 2013). Os critérios mínimos para diagnóstico de SMD envolvem a presença de displasia > 10% em pelo menos uma linhagem celular. Isso constitui um desafio, visto que a dispoese pode ocorrer em outras neoplasias, em condições reativas, e ainda, no processo natural de senescência (GLAUSER et al., 2013). A leucemogênese é um processo de várias etapas, entretanto, antes de se instalar de forma evidente, condições pré-clonais podem surgir, manifestando-se através de citopenias de origem inexplicada. Essas condições aumentam com a idade e estão de fato associadas a um aumento do risco de evolução para SMD ou outras neoplasias mielóides (VALENT 2018).

No presente estudo foi investigado o perfil de citocinas inflamatórias e angiogênicas e a expressão dos genes *TP53*, *VEGFA* e *HIF1 α* em pacientes com Síndrome Mielodisplásica, ICSU/CCUS e citopenias por causas não neoplásicas, e sua associação com diversos fatores clínicos, laboratoriais e de prognóstico. A média de idade no grupo SMD foi de 74 anos. A frequência quanto ao sexo foi semelhante (1:1). Os dados da literatura apresentam resultados divergentes. Belli et al.(2015), que avaliaram 1080 pacientes na América Latina e observaram um predomínio de indivíduos do sexo masculino (1.2:1) e mediana de idade de 69 anos na população estudada e de 68 anos para pacientes brasileiros. Porém Duarte et al. (2018) e Magalhães et al. (2010) observaram uma frequência maior de indivíduos do sexo feminino, na proporção de (2:0) e (1.03:1), respectivamente, com SMD em Fortaleza, Ceará.

Dentre os pacientes incluídos no estudo, 12 (16,6%) eram suspeitas de SMD, confirmadas após investigação clínica e laboratorial. Apesar de uma pequena casuística, esses dados foram semelhantes aos encontrados por Bastida e colaboradores (2018) que conduziram um estudo multicêntrico envolvendo quatro laboratórios, no qual indivíduos que apresentavam unicamente a anemia e/ou macrocitose como alteração do hemograma, foram investigados durante três meses para SMD. Dentre um total de 137.453 hemogramas avaliados, 290 apresentavam uma dessas condições sem causa definida. Após o diagnóstico diferencial ser realizado em 139 pacientes, 14 (10,09%) casos de SMD foram confirmados. A média de idade nesse estudo foi de 80 anos e a maioria foi classificada como baixo risco.

Os dados epidemiológicos e hematológicos não demonstram variações significativas, entre os grupos SMD, ICUS/CCUS e CNN, exceto pela contagem de monócitos, que foi

maior no grupo SMD. Esse fato pode ser atribuído aos pacientes que já apresentavam discreta monocitose no sangue periférico, porém sem leucocitose (leucócitos < 15.000/mm³). Schuler et al. 2018 apontam para a importância de investigar não apenas a monocitose periférica em pacientes com SMD, mas também a proliferação monocítica na medula e sua associação com mutações que podem aumentar o risco de evolução para Leucemia Mielomonocítica Crônica.

Quanto aos dados do cariótipo, as alterações observadas no grupo SMD foram a deleção do 5q, deleção do 11q, trissomia do cromossomo 8, trissomia do cromossomo 6, monossomia do 18, além de dois cariótipos complexos, identificados em um paciente de muito alto risco e em um paciente com SMD secundária. As alterações mais comumente encontradas na SMD a del (5q), monossomia 7 ou del (7q), trissomia 8, e del (20q), sendo observadas em torno de 40 a 60% dos pacientes com SMD primária e podendo chegar a 80% na SMD secundária (MALCOVATI et al. 2013; SHAHRABI et al, 2016).

No grupo de ICUS/CCUS foi observada apenas a perda do cromossomo Y em um paciente de 92 anos com anemia macrocítica, plaquetopenia e leves dispoeses. A perda do cromossomo Y é um achado citogenético comum em pacientes com SMD, podendo ser observada em até 15% dos pacientes (HAASE et al. 2008; SCHANZ et al. 2012). Quando é a única alteração citogenética, os pacientes apresentam sobrevida maior e bom prognóstico, comparáveis àqueles com cariótipo normal (SCHANZ et al. 2012). Porém, a perda do Y também pode ser vista em indivíduos idosos saudáveis, sem doença neoplásica na medula, constituindo um evento relacionado ao envelhecimento. O primeiro trabalho que relacionou a perda do cromossomo X em mulheres e a perda do Y em homens com a idade foi realizado por Stone e Sandberg em 1995, sendo a prevalência nos homens de 8-10%. Em pacientes com SMD a prevalência foi de aproximadamente 13% quando realizada por Fluorescência *in situ* (BRAULKE et al. 2013).

Um dos maiores desafios nos centros de hematologia para o diagnóstico da SMD e doenças relacionadas, como ICUS, CCUS, CHIP e IDUS é a disponibilidade de recursos para estudos citogenéticos e moleculares, principalmente em países em desenvolvimento, onde a morfologia ainda é o critério preponderante para o diagnóstico. As atualizações da OMS vem cada vez mais refinando variáveis e incorporando o papel das mutações tanto no diagnóstico como na classificação.

Quanto às análises das concentrações de IFN γ , TNF α , VEGFA e IL-6, não houve diferença significativa entre os grupos de SMD e ICUS/CCUs. Entretanto, quando se comparou ao grupo de citopenias não associadas a causas neoplásicas, este apresentou

significativo aumento da citocina IFN_{γ} em relação aos demais grupos. O IFN_{γ} é produzido por linfócitos $CD4+$ e por células NK, sendo um dos principais reguladores da resposta imune adaptativa. Através da modulação de genes, regula a apoptose, proliferação celular e recrutamento de leucócitos, e está envolvido em doenças mediadas por componente imune, sejam neoplásicas ou não (KORDASTI et al., 2009; SELLERI et al., 2002).

Até o presente momento não existe relato na literatura de estudos avaliando as concentrações de VEGF, IL-6, $TNF\alpha$ e IFN_{γ} em pacientes com SMD em relação à ICUS/CCUS, porém sabe-se que na SMD ocorre um estado pró-inflamatório e uma ativação de células do sistema imune, culminando na liberação de mediadores inflamatórios, de permeabilidade e angiogênese (GANAN-GOMEZ et al, 2014). A inflamação crônica é caracterizada pelo aumento circulante de citocinas e pelo acúmulo de Espécie Reativas de Oxigênio que podem levar à instabilidade genética, que, por sua vez favorecem o desenvolvimento de neoplasias e sua progressão (MANTOVANI et al. 2008).

Uma das principais vias comuns que causam a hematopoese ineficaz na SMD tem sido os variados graus de apoptose dos precursores hematopoéticos e sua progênie, sendo observado um aumento da apoptose nas classificações de menor risco comparadas àquelas de alto risco (PANG; PRICE; SAHOOD, 2011). Esse processo apoptótico nos precursores hematopoéticos encontra-se elevado na doença com citopenias periféricas associadas e diminui com a progressão da doença, permitindo assim a expansão do clone anômalo (GREENBERG 2013).

Os pacientes classificados com formas iniciais da SMD apresentaram maiores níveis de IFN_{γ} comparados àqueles com doença avançada. As células NK são mediadores conhecidos da resposta anti leucêmica nas leucemias mielóides. Na SMD, Hejazi et al. (2015) relataram uma redução nas células NK de até 20%, estando esse fato associado às formas mais graves, como o subtipo AREB. A diminuição das células NK nesses pacientes foi associada a níveis reduzidos de IFN_{γ} .

Em outro estudo, Kiladijan et al., 2006 não observaram alterações no número de células NK no sangue periférico de pacientes com SMD e doadores. Entretanto, demonstraram uma redução significativa da secreção de IFN gama nas células NK do grupo com SMD, após estímulo com IL-12 em comparação às do grupo controle. É possível que a produção deficiente ou insuficiente de células NK funcionalmente competentes e a produção de moléculas inibitórias, que reduzem a concentração de células NK e inibem sua ativação contribuam com a progressão da doença através do escape imunológico (BAIER et al., 2013)

Com relação ao TNF α , observou-se um aumento em sua concentração no estágio mais avançado da SMD em comparação às formas iniciais. Sabe-se que essa citocina está associada a um aumento da apoptose mas também tem sido observado que a mesma induz a proliferação de progenitores hematopoéticos saudáveis e anômalos. Nos estágios mais avançados da SMD é possível que a proliferação do clone maligno seja favorecida em detrimento das células saudáveis por estímulo dessa citocina (RAMOS et al.,2016).

Com relação à expressão dos genes HIF-1 α , VEGFA e TP53, os grupos SMD e ICUS/CCUS apresentaram expressão semelhante. Entretanto, quando se compara ao grupo de citopenias não associadas a causas neoplásicas, este apresenta significativo aumento na expressão do gene HIF-1 α . As células neoplásicas da medula óssea dão suporte à formação de novos vasos a partir daqueles preexistentes, como uma resposta adaptativa na tentativa de restaurar o fornecimento de O₂, no ambiente. O HIF-1 α é um ativador clássico da resposta angiogênica, induzindo diversos fatores de crescimento e modulando múltiplos aspectos da homeostase vascular (REY; SEMENZA, 2010).

Uma expressão aumentada do HIF-1 α tem sido relatada em diversas neoplasias hematológicas, como Leucemia Promielocítica, Mieloma Múltiplo, Leucemia Mielóide Aguda e Síndrome Mielodisplásica (SCHITO, REY, KONOPLEVA, 2017). O HIF-1 α é regulado por vias dependentes e independentes de oxigênio (PALAZON et al. 2014). Células progenitoras hematopoéticas e do estroma isoladas de pacientes com SMD demonstram autorrenovação e diferenciação alteradas, e o acúmulo de evidências clínicas e de pesquisa sugerem um importante papel para a inflamação sistêmica e a ativação imune na patogênese da SMD (SEMENZA 2013). Recentemente, Hayashi e colaboradores 2018, através de diversos experimentos com modelos animais e com amostras de medula de 183 pacientes com SMD de alto e baixo risco, observaram alta expressão imunohistoquímica de HIF1 α em pacientes com SMD tanto de baixo como de alto risco. Entretanto, ao comparar a expressão de mRNA desse gene nos grupos SMD e controle saudável não identificaram diferenças significativas, sugerindo assim que outras vias, mas não a do mRNA *HIF1 α* encontram-se ativadas nos pacientes com SMD.

O VEGFA é o principal marcador de angiogênese em processos fisiológicos e patológicos. É possível que em fases mais avançadas ocorra um aumento na expressão de VEGF pelas células imaturas que refletem o status da doença. Entretanto, na SMD a expressão do VEGFA tem mostrado resultados conflitantes. Wimazal et al., 2006 investigaram a expressão do mVEGFA, expressão por imuno-histoquímica e no sobrenadante de células

cultivadas dos pacientes com SMD e LMMC. Foi observado então um aumento na expressão de VEGFA na medula por imunohistoquímica na SMD em comparação ao controle saudável. Além disso, os pacientes com os subtipos AREB, AREB-t e LMMC apresentaram expressão aumentada em comparação àqueles com citopenia em única linhagem e anemia refratária com sideroblastos em anel. Foi observado ainda um aumento nos níveis de VEGF no sobrenadante de células cultivadas de acordo com o tempo de cultivo. A análise do mVEGFA foi realizada a fim de confirmar sua expressão por células mononucleares na SMD, porém não foi feita uma comparação com controle ou entre os subtipos da doença. Por outro lado, Del Rey e colaboradores (2013) compararam os níveis de VEGF circulantes da medula de indivíduos saudáveis, pacientes com SMD de baixo risco (exceto CRDM, CRDM) e alto risco e não foi observado diferenças entre os grupos.

No presente estudo, a expressão de VEGFA não apresentou diferença significativa entre os diferentes grupos. Entretanto, a expressão de VEGFA mostrou associação com os níveis de hemoglobina maiores. Esse resultado sugere que onde ocorre maior expressão desse gene há maior estímulo da eritropoese e de hemoglobina, promovendo maior aporte de oxigênio. É possível que nos pacientes submetidos à anemia mais severa, mecanismos de inibição ou vias paralelas estejam atuando, impedindo atuação dos genes HIF1A e VEGF, os quais mostraram correlação entre si.

O gene TP53 atua como um supressor tumoral e desempenha um papel importante na manutenção da estabilidade do genoma, portanto, é previsível a ocorrência de mutação em mais de 50% das neoplasias, em que a perda facilita a transformação maligna. A maioria das mutações envolvendo esse gene é do tipo *missense*, que codificam uma proteína alterada, incapaz de se ligar ao DNA e agir como ativador/repressor transcricional. Essa proteína apresenta maior estabilidade em parte por não conseguir induzir a degradação pelo MDM2 (MULLER et al. 2008).

No presente estudo, avaliou-se a expressão do gene TP53. Existem raros estudos avaliando a expressão gênica do TP53 na SMD, sendo mais comuns em pacientes com deleção do 5q. Dutt et al. 2011 e Pellagatti et al. 2010 demonstraram que nesse subgrupo da SMD, ocorre um aumento na apoptose associada à maior expressão do gene TP53 e da indução de p53 em células da linhagem eritróide na medula desses pacientes. Liu et al. 2017 demonstraram que o bloqueio de um gene próximo à região de deleção do 5q promove uma superexpressão de TP53 e conseqüentemente da apoptose.

O fato de a expressão de TP53 na SMD e no grupo ICUS/CCUS terem tido valores médios próximos pode ser devido à grande maioria dos pacientes com SMD apresentarem uma estratificação de baixo ou de risco intermediário. Existem relatos controversos quanto à interação entre os genes *HIF1α* e *TP53*. Algumas linhas de pesquisa apontam que o HIF, uma vez estabilizado devido às condições de hipóxia comum ao ambiente neoplásico, se ligue ao p53, estabilizando-o e prevenindo sua inativação (SERMEUS et al. 2011). Assim, a hipóxia grave e/ou prolongada atuariá a apoptose que é iniciada quando o HIF1 estabiliza o p53. Entretanto, Nardinocchi et al. 2009 sugeriram que o HIF-1 pode impedir a atividade do p53 pela inibição da proteína de supressão tumoral HIPK2. A HIPK2 fosforila o p53, ativando sua função. A inibição do HIPK2 também pode ocorrer pela super-regulação do MDM2 (NARDINOCCHI et al. 2011).

Os dados acerca da expressão gênica de citocinas na SMD são conflitantes. De uma forma geral, observar-se um aumento na expressão de citocinas inflamatórias, como IL-6, TNF α e IFN γ , e do fator pró-angiogênico VEGFA (RANKIN et al., 2015). Entretanto, alguns estudos, como o de Lopes et al., 2017, que avaliou a expressão de diversas citocinas na SMD, LMA de novo e LMA secundária com características displásicas, somente observaram diferenças na expressão entre os dois subtipos de LMA. No grupo SMD, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle saudável e com os subtipos de LMA.

A fibrose é um achado histológico encontrado em cerca de 10 a 20% dos pacientes com SMD. Trata-se de um fator relacionado a pior prognóstico e menor sobrevida. De fato, no presente estudo observou-se a presença da fibrose em pacientes com maior estratificação de risco pelo R-IPSS. Em estudo prévio, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado o papel da fibrose na evolução da doença e na sobrevida de pacientes com SMD de baixo risco (DUARTE et al.2018; DUARTE et al. 2014). Apesar de ainda não haver sido incorporada como critério nos sistemas de estratificação de risco, tem sido associada a displasia em múltiplas linhagens, severas citopenias, dependência transfusional e menor sobrevida (DELLA PORTA; MALCOVATI, 2009; RAMOS et al., 2016).

No presente estudo foi observada uma associação entre a presença da fibrose e os níveis de TNF-alfa, citocina pró inflamatória que exerce diversos efeitos biológicos, estando presente em várias doenças. Em outras patologias, como doenças cardiovasculares, sabe-se que o TNF-alfa promove uma remodelação do músculo cardíaco, caracterizado pelo aumento da atividade da matriz metaloproteinase, com conseqüente aumento da fibrose

(SIVASUBRAMANIAN et al. 2001). Na SMD, Um estudo conduzido por Ramos et al., (2016) investigou a associação entre os níveis das citocinas IL-6, TNF α e p53 solúvel, no sangue periférico de pacientes com SMD e fibrose variando do grau M0 a M3, porém nenhuma associação foi observada nessas variáveis.

Estudos têm mostrado ainda que diversas citocinas inflamatórias estão associadas ao desenvolvimento de fibrose. Citocinas que ativam a via JAK/STAT3 favorecem a sobrevivência de células, como fibroblastos, células endoteliais e células do estroma medular. As citocinas mais envolvidas nesse processo são IL-8, oncostatina-M, lipocalina-2, TGF β 1 e VEGF. Apesar de o papel do TNF-alfa não estar esclarecido nessas doenças, sabe-se que o mesmo está aumentado nessas condições e que promove a sobrevivência de células neoplásicas em detrimento de células saudáveis e que o seu receptor TNFR2 exerce um papel crucial na mediação da expansão clonal induzida por TNF α (HEATON et al. 2018).

O papel das citocinas na carcinogênese é complexo e ambíguo, uma vez que podem de forma seletiva causar apoptose em células endoteliais tumorais, porém também podem promover o aumento do crescimento tumoral. Por um lado, espera-se que o sistema imune previna ou adie o surgimento de clones, através da atividade antitumoral inata ou reconhecimento específico de neoantígenos, entretanto é provável que as células clonais na SMD encontrem uma maneira de escapar da vigilância imunológica. Um estado inflamatório no microambiente medular pode ser uma causa ou consequência da doença. A inflamação crônica pode apoiar imunidade, mas também tem efeito sistêmico agravando o quadro clínico. Em contrapartida, os clones anômalos conseguem assumir o sistema imunológico através da produção de imunomoduladores citocinas (IL-4, IL-10 e TGF β) e fatores de crescimento (VEGF, TNF α , trombopoietina, etc.) e modulando a atividade das células reguladoras.

Com relação à evolução da doença, durante o seguimento do estudo houve três óbitos, todos no grupo SMD, sendo dois casos com AREB I e um SMD/SMP. Nas três situações houve transformação leucêmica, com componente monocítico. Na SMD ocorrem alterações principalmente nas linhagens mielocíticas e monocíticas (LAMBERT; WU; AANEL, 2016). Os níveis de citocinas foram associados a pior prognóstico, porém não houve impacto na sobrevivência dos pacientes no presente estudo. Esse fato pode ser atribuído ao curto período do estudo, podendo ser avaliado posteriormente.

O 13º Workshop do European Bone Marrow Working Group recentemente publicou um artigo voltado para discussão dos desafios do diagnóstico da SMD dentro do cenário das

novas entidades pré-clonais. Foram apresentados 17 casos de citopenias que através da análise morfológica, citogenética e de sequenciamento para análise de mutações, tiveram diagnóstico diferencial. É interessante ressaltar que alguns casos progrediram para outras neoplasias como Mieloma Múltiplo e doenças mieloproliferativas. Em todos os pacientes foi realizada a expressão da proteína p53, enfatizando a importância da expressão desse gene na SMD. O grupo recomenda a análise do p53 em todas as citopenias não esclarecidas com ou sem displasia e em todos os subtipos de SMD, ao diagnóstico e durante o acompanhamento (HEBEDA et al. 2019).

6 CONCLUSÃO

No presente estudo, os pacientes com SMD apresentaram maior média de idade em comparação aos demais grupos de pacientes. Os parâmetros do hemograma foram semelhantes nos três grupos, exceto pela contagem de monócitos, maior no grupo CNN.

Os pacientes com CNN apresentaram maiores níveis de IFN_{γ} em comparação aos grupos SMD e ICUS/CCUS

Quanto aos genes estudados, observou-se maior expressão do gene *HIF1 α* também no grupo CNN, em comparação aos indivíduos dos grupos SMD e ICUS/CCUS.

Observou-se uma associação dos níveis plasmáticos de $TNF\alpha$ e a contagem de plaquetas e uma associação entre a expressão do mRNA *VEGFA* e os níveis de hemoglobina nos grupos em estudo.

Quanto aos fatores de prognóstico, não houve associação entre os genes e as citocinas estudadas e a celularidade da medula, número de blastos e citogenética. Com relação à mielofibrose, houve uma associação com os níveis plasmáticos de $TNF\alpha$ e de IL-6 nos pacientes com SMD.

Em relação aos genes estudados, observou-se uma correlação entre a expressão dos genes *HIF1 α* e *TP53* nos três grupos e entre os genes e *HIF1 α* e *VEGFA* nos pacientes com SMD.

Quanto à análise de sobrevida, os parâmetros avaliados não demonstraram influência significativa na sobrevida durante o seguimento do estudo.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo levantam questões relevantes quanto ao comportamento a nível de expressão gênica em diferentes doenças que cursam com citopenias. Esse é o primeiro trabalho de nosso conhecimento que compara a expressão de genes associados à angiogênese e citocinas moduladoras do microambiente medular num grupo de SMD e ICUS.

Diante de algumas das limitações encontradas nesse estudo, levanta-se um questionamento sobre o papel da análise molecular no diagnóstico preciso dos pacientes em centros hematológicos de países em desenvolvimento. Na era molecular, qual o papel da morfologia na estratificação desses grupos? Diante dos resultados e da vasta revisão de literatura, percebe-se a necessidade de acompanhamento clínico e laboratorial dos indivíduos classificados como ICUS/CCUS, visando uma monitorização adequada, tendo em vista a não disponibilidade de recursos que propiciem uma investigação complexa e de caráter preventivo, o que seria ideal. O seguimento clínico desses pacientes e a realização dos exames necessários ou repetição dos mesmos quando possível, certamente elucidarão alguns casos, possibilitarão ainda uma melhor estratificação dos pacientes já diagnosticados.

Os estudos comparativos entre SMD e ICUS enfatizam a relação em termos de diagnóstico, como diferenças de celularidade medular, intensidade da dispoese, número de blastos, dentre outros; porém poucos têm investigado o microambiente em que as células progenitoras hematopoéticas e as células do estroma estão envolvidas nessas distintas, mas relacionadas doenças. Assim, os resultados do presente estudo com certeza auxiliarão na expansão do conhecimento acerca da influência desses genes e dos imunomoduladores no microambiente medular. Por fim, esse estudo abre portas para uma análise sobre os possíveis mecanismos que justifiquem as semelhanças e diferenças encontradas na Síndrome Mielodisplásica e na Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado.

REFERÊNCIAS

- ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v.383, n.9936, p.2239-2252, 2014.
- ALEXANDRAKIS, M. G.; PASSAM, F. H.; PAPPAS, C. A. Relation between bone marrow angiogenesis and serum levels of angiogenin in patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk Res.**, v.29, p.41-46, 2005.
- ARBER, D.A. et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p.2391-2405, 2016.
- ASAHARA, T.; MUROHARA, T.; SULLIVAN, A. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. **Science**, v.275, p.964-967, 1997.
- BACHEGOWDA, L.; GLIGICH, O.; MANTZARIS I, SCHINKE C, WYVILLE, D.; CARRILLO, T.; BRAUNSCHWEIG, I.; STEIDL, U.; VERMA A. Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes. **J Hematol Oncol**.v.10, n.6, p.50, 2013.
- BAIER, C.; FINO, A.; SANCHEZ, C.; FARNAULT, L.; RIHET,P.; KAHN-PERLÈS, B.; COSTELLO, R.;T. Natural killer cells modulation in hematological malignancies. **Frontiers in immunology**. v.4, p. 459, 2013.
- BASTIDA, J.M.; LÓPEZ-GODINO, O.; VICENTE-SÁNCHEZ, A.; BONANAD-BOIX, S.; XICOY-CIRICI, B.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, J.M.; SUCH, E.; CERVERA, J.; CABALLERO-BERROCAL, J.C.; LÓPEZ-CADENAS, F.; ARNAO-HERRÁIZ, M.; RODRÍGUEZ, I.; LLOPIS-CALATAYUD, I.; JIMÉNEZ, M.J.; DEL CAÑIZO-ROLDÁN, M.C.; DÍEZ-CAMPELO, M. Hidden myelodysplastic syndrome (MDS): A prospective study to confirm or exclude MDS in patients with anemia of uncertain etiology.**Int J Lab Hematol**. v.41, n.1, p. 109-117, 2018.
- BEJAR, R.; LEVINE, R.; EBERT, B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **J.Clin.Oncol.**, v.29, p.504-515, 2011.
- BELLI, C. B.; PINHEIRO, R. F.; BESTACH, Y.; LARRIPA, I. B.; DA SILVA TANIZAWA, R.S.; ALFONSO, G.; . Myelodysplastic syndromes in South America: a multinational study of 1080 patients. **Am J Hematol.**, v.90, n.10, p.851-858, 2015.
- BENNET, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol.**, v.51, p.198-199, 1982.
- BENNETT, J. M. Changes in the Updated 2016: WHO Classification of the Myelodysplastic Syndromes and Related Myeloid Neoplasms. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, v.16, n.11, p. 607–609, 2016.
- BENSAAD, K.; VOUSDEN, K.; H. p53: new roles in metabolism. **Trends Cell Biol**. v.17, n.6, p.286-91, 2007.

BERAN, M.; SHEN, Y.; KANTARJIAN, H. High-dose chemotherapy in high-risk myelodysplastic syndrome: covariate-adjusted comparison of five regimens. **Cancer**, v.92, p.1999–2015, 2001.

BORTOLHEIRO, T.C., Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 3, n. 28, p.194-197, 2006.

BOWEN, D. T. Occupational and environmental etiology of MDS. **Best Pract Res Clin Haematol.** v.26, n.4, p.319-26, 2013.

BRAULKE F, JUNG K, SCHANZ J, GÖTZE K, MÜLLER-THOMAS C, PLATZBECKER U, GERMING U, BRÜMMENDORF TH, BUG G, OTTMANN O, GIAGOUNIDIS AA, STADLER M, HOFMANN WK, SCHAFHAUSEN P, LÜBBERT M, SCHLENK RF, BLAU IW, GANSTER C, PFEIFFER S, SHIRNESHAN K, METZ M, DETKEN S, SERAPHIN J, JENTSCH-ULLRICH K, BÖHME A, SCHMIDT B, TRÜMPER L, HAASE D. Molecular cytogenetic monitoring from CD34+ peripheral blood cells in **myelodysplastic syndromes**: first results from a prospective multicenter German diagnostic study. **Leuk Res.v.**;37, n.8, p.900-6, 2013.

BRUNNING, R.; D.; ORAZI, A.; GERMING, U. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; PILERI, S. A.; STEIN, H.; THIELE, J.; VARDIMAN, J. W. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. **Lyon: IARC Press**, 2008. p. 88-93.

CARGO C. A.; ROWBOTHAM N.; EVANS P. A. Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression. **Blood**, v.126 p.2362–2365, 2015.

CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v.122, n.25, p.4021-4034, 2013.

CHAMBERS, S. M.; GOODELL, M. A. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. **Stem Cell Rev.**, v.3, n.3, p.201-11, 2007.

CHEN, X. Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. **J Clin Invest.**, v.123, n.11, p.4595–4611, 2013.

CHESON, B. D.; GREENBERG, P. L.; BENNETT, J. M. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. **Blood**, v.108, p.419–425, 2006.

CHEUNG E.;C.; VOUSDEN, K.;H. The role of p53 in glucose metabolism. **Curr Opin Cell Biol.** v.22, n.2, p.186-91, 2010.

CHUNG, S.;S.; PARK, C.;Y. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** v.2017, n.1, p.73-78, 2017.

CLUZEAU, T.; MCGRAW, K. L.; IRVINE, B.; MASALA, E. Pro-inflammatory proteins S100A9 and tumor necrosis factor- α suppress erythropoietin elaboration in myelodysplastic

syndromes. **Haematologica**, v.102, n.12, p.2015-2020, 2017.

COGLE, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Curr Hematol Malign Rep**, v.10, n.3, p.272-281, 2015.

DEL REY, M.; PERIACHO, M.; VELASCO, S.; LUMBRERAS, E.; LÓPEZ-NOVOA, J.M.; HERNÁNDEZ-RIVAS, J.M.; RODRÍGUEZ-BARBERO, A. Alteration in Endoglin-Related Angiogenesis in Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia. **PLoS One** v.8, n.1, p. e53624, 2013.

DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L.; BOVERI, E. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol.**, v.27, n.5, p.754-762, 2009.

DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L.; RIGOLIN, G. M. Immunophenotypic, cytogenetic and functional characterization of circulating endothelial cells in myelodysplastic syndromes. **Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund.**, v.22, p. 530-537, 2008.

DELLA PORTA, M. G.; TRAVAGLINO, E.; BOVERI, E.; PONZONI, M.; . Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v.29, n.1, p.66-75, 2015.

DUARTE, F.B.; GONÇALVES, R.P.; BARBOSA, M.C.; ROCHA, F.D.; JESUS DOS SANTOS, T.E.; SANTOS, T.N.; VASCONCELOS, P.R.L. Tumor suppressor p53 protein expression: prognostic significance in patients with low-risk myelodysplastic syndrome. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v.36, n.3, p.196-201, 2014

DUARTE, F.B.; BARBOSA, M.C.; JESUS DOS SANTOS, T.E.; LEMES, R.P.G.; VASCONCELOS, J.P.; DE VASCONCELOS, P.R.L.; ROCHA, D.; ZALCBERG, I.; COUTINHO, D.F. Bone marrow fibrosis at diagnosis is associated with TP53 overexpression and adverse prognosis in low-risk myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol.** v.181, n.4, p.547-549, 2018.

DUNN, D. E.; TANAWATTANACHAROEN, P.; BOCCUNI, P. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. **Ann Intern Med.** v.131, p.401–408, 1999.

DUTT, S.; NARLA, A.; LIN, K.; MULLALLY, A.; ABAYASEKARA, N.; MEGERDICHIAN, C.; WILSON, F.H.; CURRIE, T.; KHANNA-GUPTA, A.; BERLINER, N.; KUTOK, J.L.; EBERT, B.L. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. **Blood** v.117, p.2567–2576, 2011.

EPLING-BURNETTE, P.K.; PAINTER, J.; S.; ROLLISON, D.; E.; KU, E.; VENDRON, D.; WIDEN, R.; BOULWARE, D.; ZOU, J.; X.; BAI, F.; LIST, A.; F. Prevalence and clinical association of clonal T-cell expansions in Myelodysplastic Syndrome. **Leukemia.** v.21(4):659-67, 2007.

- FENAUX, P.; MUFTI, G. J.; HELLSTROM-LINDBERG, E. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. **Lancet Oncol.**, v.10, p.223–232, 2009.
- FLACH J, BAKKER ST, MOHRIN M. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. **Nature**. v.512, n.7513, p.:198-202, 2014.
- GAÑÁN-GÓMEZ, I.; WEI, Y.; STARCZYNOWSKI, D.T.; COLLA, S.; YANG, H.; CABRERO-CALVO, M.; BOHANNAN, Z.S.; VERMA, A.; STEIDL, U.; GARCIA-MANERO, G. Deregulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**. v. 29, n. 7, p.1458-1469, 2015.
- GANGAT, N.; PATNAIK, M.M.; TEFFERI, A., Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **American Journal Of Hematology**, v. 91, n. 1, p.76-89, 2015.
- GERMING, U. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.** v. 87, n. 9, p. 691-699, 2008.
- GIAGOUNIDIS, A.; MUFTI, G. J.; MITTELMAN, M. Outcomes in RBC transfusion-dependent patients with low-/intermediate-1-risk myelodysplastic syndromes with isolated deletion 5q treated with lenalidomide: a subset analysis from the MDS-004 study. **Eur J Haematol.**, v.93, p.429–438, 2014.
- GIAGOUNIDIS, A.; HAASE, D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. **Best Pract Res Clin Haematol.** v.26, n.4, p.337-53, 2013..
- GIRALDO P, NOMDEDEU B, LOSCERTALES J. Darbepoetin alpha for the treatment of anemia in patients with myelodysplastic syndromes. **Cancer**. v.107, p.2807–2816, 2006.
- GLADEK, I.; FERDIN J.; HORVAT S.; CALIN G. A.; KUNEJ T. HIF1A gene polymorphisms and human diseases: Graphical review of 97 association studies. **Genes Chromosomes Cancer**, v.56, n.6, p.439-452, 2017.
- GLAUSER, T.;A.; SAGATYS, E.;M.; WILLIAMSON, J.;C.; BURTON, B.;S.; BERGER, C.; MERWIN, P.; SUGRUE, M.; BENNETT, J.; M. Current pathology practices in and barriers to MDS diagnosis. **Leuk Res.**v.37,12, p.1656-61, 2013.
- GREENBERG P.L. The multifaceted nature of myelodysplastic syndromes: clinical, molecular, and biological prognostic features. **J Natl Compr Canc Netw**. v.11, n.7, p.877-84, 2013.
- GREENBERG, P. L.; ATTAR, E.; BENNETT, J. M.; BLOOMFIELD, C. D.; BORATE, U.; DE CASTRO, C. M., .Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.**J Natl Compr Canc Netw**, v.480, n.11, p.838-874, 2017.
- GREENBERG, P. L.; ATTAR, E.; BENNETT, J. M.; BLOOMFIELD, C. D.; BORATE, U.; DE CASTRO, C. M., . NCCN Practice Guidelines for myelodysplastic syndromes, Version1.

2014. **J Natl Compr Canc Netw**, v.480, n.11, p.838-874, 2013.

GREENBERG, P. L.; TUECHLER, H.; SCHANZ, J.; SANZ, G.; GARCIA-MANERO, G.; SOLÉ, F.; BENNETT, J. M.; BOWEN, D.; FENAUX, P.; DREYFUS, F.; KANTARJIAN, H.; KUENDGEN, A.; LEVIS, A.; MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M.; CERMAK, J.; FONATSCH, C.; LE BEAU, M. M.; SLOVAK, M.L.; KRIEGER, O.; LUEBBERT, M.; MACIEJEWSKI, J.; MAGALHAES, S. M.; MIYAZAKI, Y.; PFEILSTÖCKER, M.; SEKERES, M.; SPERR, W. R.; STAUDER, R.; TAURO, S.; VALENT, P.; VALLESPI, T.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; GERMING, U.; HAASE, D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-2465, 2012.

GREENBERG, P. The myelodysplastic syndromes. In: Hoffman R, Benz E, Shattil S, , eds. Hematology: Basic Principles and Practice, 3rd ed. **New York, NY:Churchill Livingstone**; v.2000, 1106–1129, 2000.

GREENBERG, P.L. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p.2079-2088, 1997

GRIGNANO, E.; JACHIET, V.; FENAUX, P.; ADES, L.; FAIN, O.; MEKINIAN, A. Autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol.**, v.97, n.11, p.2015-2023, 2018.

HAASE, D. Cytogenetics features in myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v.87, p.515-526, 2008.

HAFERLACH, T.; NAGATA, Y.; GROSSMANN, V. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v.28, p.241–247, 2014.

HANSEN, J. W.; WESTMAN, M. K.; SJO, L. D. Mutations in idiopathic cytopenia of undetermined significance assist diagnostics and correlate to dysplastic changes. **Am J Hematol.**, v.91, n.12, p.1234-1238, 2016.

HAYASHI, Y.; ZHANG, Y.; YOKOTA, A.; YAN, X.; LIU, J.; . Pathobiological Pseudohypoxia as a Putative Mechanism Underlying Myelodysplastic Syndromes. **Cancer Discov.**, v.8, n.11, p.1-20, 2018.

HEATON, W.; L.; SENINA, A.;V.; POMICTER, A.;D.; SALAMA, M.;E.; CLAIR, P.;M.; YAN, D.; BELL, R.;N.; GILILLAND, J.;M.; PRCHAL, J.;T.; O'HARE, T.; DEININGER, M.;W. Autocrine Tnf signaling favors malignant cells in myelofibrosis in a Tnfr2-dependent fashion. **Leukemia**. v.32, n.11, p. 2399-2411, 2018.

HEBEDA, K.;M; TZANKOV, A.;BOUDOVA, L.;SAFT, L.;HASSERJIAN, R.P.;DE BOER, M.;FEND, F.;ORAZI, A.;LEGUIT, R. Challenges in Diagnosing Myelodysplastic Syndromes in the Era of Genetic Testing: Proceedings of the 13th Workshop of the European Bone Marrow Working Group. **Pathobiology**, v.;86, n.1, p.62-75, 2019.

HEJAZI, M.; MANSER, A.;R.; FRÖBEL, J.; KÜNDGEN, A.; ZHAO, X.; SCHÖNBERG, K.; GERMING, U.; HAAS, R.; GATTERMANN, N.; UHRBERG, M. Impaired cytotoxicity

associated with defective natural killer cell differentiation in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**. v.100, n.5, p. 643-52, 2015.

HONG, M.; HE G. The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myelodysplastic Syndromes. **J Transl Int Med**. v.5,n.3, p.139-143, 2017

INVERNIZZI, R.; TRAVAGLINO, E.; DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L.; GALLÌ, A.; BASTIA, R.; CIOLA, M.; AMBAGLIO, I.; BOVERI, E.; ROSTI, V.; CAZZOLA, M. Vascular endothelial growth factor overexpression in myelodysplastic syndrome bone marrow cells: biological and clinical implications. **Leuk Lymphoma**, v.58, n.7 p.1711-1720, 2017.

IRONS R. D.; KERZIC P. J. Cytogenetics in benzene-associated myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: new insights into a disease continuum. **Ann N Y Acad Sci**, v.1310, p.84-88, 2014.

ISCN 2005 : an international system for human cytogenetic nomenclature (2005) : recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature, Switzerland, 2005.

ISSA, J. P. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. **Blood**, v.121, n.19, p.3811-3817, 2013.

IVAN, M.; KONDO, K.; YANG, H.; KIM, W.; VALIANDO, J.; OHH, M.; SALIC, A.; ASARA, J. M.; LANE, W. S.; KAELIN, W. G. Jr. HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. **Science**, v. 292, n.5516 p.464–468, 2001.

JADERSTEN, M.; SAFT, L.; PELLAGATTI, A. Clonal heterogeneity in the 5q-syndrome: p53 expressing progenitors prevail during lenalidomide treatment and expand at disease progression. **Haematologica**, v.94, p.1762–1766, 2009.

JADERSTEN. M.; SAFT. L.; SMITH, A. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. **J Clin Oncol**, v.29, p.1971–1979, 2011.

JAFFE, E. S., SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., HARRIS, N. L., PILERI, S. A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J. W. **WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, France, 2001.

KARAMAN, T.; LEPPÄNEN, V-M.; ALITALO, K. Vascular endothelial growth factor signaling in development and disease. **Development**, v. 145, n. 14, p.1-8, 2018.

KASTENHUBER, E. R., LOWE, S. W. Putting p53 in context. **Cell**, v.170, n.6, p.1062-1078, 2017.

KILADJIAN, J.J.; BOURGEOIS, E.; LOBE, I.; BRAUN, T.; VISENTI, N G.; BOURHIS, J.H.; FENAUX, P.; CHOUAIB, S.; CAIGNARD ,A. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**. v. 20, n.3, p. 463-70, 2006.

- KIM, C. K.;HAN, D. H.;JI, Y. S.;LEE, M. S.;MIN, C. W.: Biomarkers of angiogenesis as prognostic factors in myelodysplastic syndrome patients treated with hypomethylating agents. **Leuk Res.**, v.50, p.21-28, 2016.
- KOCH, S.; CLAEISSON-WELSH, L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. **Cold Spring Harbor Perspect. Med.**, v.2, n.7, 2012.
- KORDASTI, S.;Y.; AFZALI, B.; LIM, Z.; INGRAM, W.; HAYDEN, J.; BARBER, L.; MATTHEWS, K.; CHELLIAH, R.; GUINN, B.; LOMBARDI, G.; FARZANEH, F.; MUFTI, G.;J. IL-17-producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol.** v.145, n.1, p.64-72, 2009.
- KORKOLOPOULOU, P.; APOSTOLIDOU, E.; PAVLOPOULOS, P. M.; . Prognostic evaluation of the microvascular network in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v.15, p.1369-1376, 2001.
- KULASEKARARAJ, A. G.; MOHAMEDALI, A. M.; MUFTI, G. J. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **B J Haematol.**, v.162, p. 587–605, 2013.
- LAMBERT, C.; WU, Y.; AANEI, C. Bone Marrow Immunity and Myelodysplasia. **Front Oncol.** v.6, 172, 2016.
- LATCHNEY, S.; E.; CALVI, L.; M. The aging hematopoietic stem cell niche: Phenotypic and functional changes and mechanisms that contribute to hematopoietic aging. **Semin Haematol.** v.54, n.1, p.25-32, 2017.
- LIST, A.; KURTIN, S.; ROE, D. J. Efficacy of lenalidomide in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med.**, v.352, p.549–557, 2005.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D., Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p.402-408, 2001.
- LOOK, A.; T. Molecular Pathogenesis of MDS. **Hematology**, p. 156-160, 2005.
- LOPES, M.R.; PEREIRA, J.K.N; CAMPOS, P.M.; MACHADO-NETO, J.A.M; TRAINA, F.; SAAD, S.T.O.; FAVARO, P. De novo AML exhibits greater microenvironment dysregulation compared to AML with myelodysplasia-related changes. **Sci Rep.**v.7, p. 40707, 2017.
- LU, L.; PAYVANDI, F.; WU, L.; ZHANG, L.; H.; HARIRI, R.;J.; MAN, H.;W.; CHEN, R.;S.; MULLER, G.;W.; HUGHES, C.;C.; STIRLING, D.;I.; SCHAFER, P.;H.; BARTLETT, J.;B. The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions. **Microvasc Res.** v.77, n.2, p.78-86, 2009
- LUBBERT, M.; SUCIU, S.; BAILA, L. Low-dose decitabine versus best supportive care in elderly patients with intermediate- or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) ineligible for intensive chemotherapy: final results of the randomized phase III study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group and the German MDS

Study Group. **J Clin Oncol.**, v.29, p.1987–1996, 2011.

MADRY, K.; DWILEWICZ-TROJACZEK, J.; SULEIMAN, W.; PASZKOWSKA-KOWALEWSKA, M.; ZIARKIEWICZ-WRÓBLEWSKA, B. Angiogenesis in bone marrow of myelodysplastic syndrome patients. **Pol Arch Med Wewn.** v.117, n.4, p.25-30, 2007.

MAGALHÃES, S. M. M.; MADEIRA, T. S.; BITTENCOURT, R.; VELLOSO, E.; CHAUFFAILLE, M. L.; AZEVEDO, A. A.; FAGUNDES, E. M.; ZANICHELLI, M. A.; BONFIM, G.; MELO, L. G.; TAVARES, R. S.; BORTOLHEIRO, T. C. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic 130 Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. **Blood**, v. 116, ab.1884, 2010.

MALCOVATI, L. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net. **Blood**, v.122, n.17, p.2943-2964, 2013.

MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M. The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). **Hematology Am Soc Hematol Educ Program.**, v.2015, p.299-307, 2015.

MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M. G.; STRUPP, C.; AMBAGLIO, I.; KUENDGEN, A.; NACHTKAMP, K.; .Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). **Haematologica**, v.96, p.1433-1440, 2011.

MALCOVATI, L.; GALLI, A.; TRAVAGLINO, E. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. **Blood**, v.129, p.3371-3378, 2017.

MALCOVATI, L.; NIMER, S.;D. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. **Cancer Control**. Suppl:4-13, 2008.

MALLO, M.; DEL REY, M.; IBANEZ, M. Response to lenalidomide in myelodysplastic syndromes with del (5q): influence of cytogenetics and mutations. **Br J Haematol.**, v.162, p.74–86, 2013.

MARCONDES, A. M. Dysregulation of IL-32 in myelodysplastic syndrome and chronic myelomonocytic leukemia modulates apoptosis and impairs NK function. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.105, n.8, p.2865–2870, 2008.

MEKINIAN, A. Inflammatory arthritis in patients with myelodysplastic syndromes: a multicenter retrospective study and literature review of 68 cases. **Medicine (Baltimore)**, v.93, n.1, p.1–10, 2014.

MULLER, P.; HRSTKA, R.; COOMBER, D.; LANE, D.P.; VOJTESEK, B. Chaperone-dependent stabilization and degradation of p53 mutants. **Oncogene** v.27, n.24, p. :3371–3383, 2008.

NARDINOCCHI, L.; PUCA, R.; D'ORAZI, G. HIF-1 alpha antagonizes p53-mediatedapoptosis by triggering HIPK2 degradation. **Aging-U**s v.,3, n.1, p.33–43, 2011.

- NARDINOCCHI, L.; PUCA, R.; SACCHI A, RECHAVI G, GIVOLD, D'ORAZI G. Targeting hypoxia in cancer cells by restoring homeodomain interacting protein-kinase 2 and p53 activity and suppressing HIF-1 alpha. **PLoS One** v.4, n.8, p.e6819, 2009.
- NYBAKKEN G. E.; BAGG A. The genetic basis and expanding role of molecular analysis in the diagnosis, prognosis, and therapeutic design for myelodysplastic syndromes. **J Mol Diagn.**, v.16, p.145-158, 2014.
- PALAZON, A.; GOLDRATH, A.; W.; NIZET, V.; JOHNSON, R.S. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. **Immunity** v.41, n.4, p.518-28, 2014.
- PANG, W.; W.; PRICE, E.; A.; SAHOO, D. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci USA*. v.108, n.50, p.20012-20017, 2011.
- PANG, W.W.; PLUVINAGE, J.V.; PRICE, E.A.; On hematopoietic stem cell and progenitor cell mechanisms in myelodysplastic syndromes. **Proc Natl Acad Sci** v.110, p.3011–3016, 2013.
- PAPAEMMANUIL, E.; GERSTUNG, M.; MALCOVATI, L. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.122, p.3616–3627, 2013.
- PELLAGATTI, A.; MARAFIOTI, T.; PATERSON, J.C.; BARLOW, J.L.; DRYNAN, L.F.; GIAGOUNIDIS, A. Induction of p53 and up-regulation of the p53 pathway in the human 5q-syndrome. **Blood** v.115, p. 2721–2723, 2010.
- RAMOS, F.; ROBLEDO, C.; IZQUIERDO-GARCÍA, F.M.; SUÁREZ-VILELA, D.; BENITO, R.; FUERTES, M.; INSUNZA, A.; BARRAGÁN, E.; DEL REY, M.; DE MORALES, TORMO, M.; SALIDO, E.; ZAMORA, L.; PEDRO, C.; SÁNCHEZ-DEL-REAL, J.; DÍEZ-CAMPELO, M.; DEL CAÑIZO, C.; SANZ, G.F.; HERNÁNDEZ-RIVAS, J.M. Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including mutational analysis. **Oncotarget**. v. 7, n.21, p. 30492–30503, 2016.
- RANKIN, E. B., NARLA, A.; PARK, J. K.; LIN S.; SAKAMOTO, K. M. Biology of the bone marrow microenvironment and myelodysplastic syndromes. **Mol Genet Metab** v.116, p. 24–28, 2015.
- REY, S.; SEMENZA, G.L. Hypoxia-inducible factor-1-dependent mechanisms of vascularization and vascular remodelling. **Cardiovasc Res**. v.86, p. 236–242, 2010.
- ROSE, J. A.; ERZURUM, S.; ASOSINGH, K. Biology and flow cytometry of proangiogenic hematopoietic progenitors cells. **Cytometry A**, v.87, p.5-19, 2015.
- ROSSI DJ, BRYDER D, ZAHN, J.; M. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.102, n.26, p.9194-9199, 2005.
- SALVEN, P.; MÄNPÄÄ, H.; ORPANA, A.; ALITALO, K.; JOENSUU, H. Serum vascular

endothelial growth factor is often elevated in disseminated cancer. **Clin Cancer Res.** v.3, n.5, p.647-51, 1997.

SAULLE, E.; PETRONELLI, A.; **PELOSI**, E.; COPPOTELLI, E.; PASQUINI, L.; ILARI, R.; LO-COCO, F.; TESTA, U. PML-RAR alpha induces the downmodulation of HHEX: a key event responsible for the induction of an angiogenetic response. **J Hematol Oncol.** v.9, p.33, 2016.

SAUNTHARARAJAH, Y.; NAKAMURA, R.; NAM, J. M. HLA-DR15 (DR2) is over represented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. **Blood.** v.100, p.1570–1574, 2002.

SCHANZ, J.; TUCHLER, H.; SOLE, F. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. **J Clin Oncol.**, v.30, n.8, p.820–829, 2012.

SCHITO, L.; REY, S.; KONOPLEVA, M. Integration of hypoxic HIF- α signaling in blood cancers. **Oncogene**.v.36, n.38, p.5331-5340, 2017.

SCHULER, E.;FRANK, F.;HILDEBRANDT, B.;, BETZ, B.;STRUPP, C.;RUDELIUS, M.;AUL, C.;SCHROEDER, T.;GATTERMANN, N.;HAAS, R.;GERMING, U. Myelodysplastic syndromes without peripheral monocytosis but with evidence of marrow monocytosis share clinical and molecular characteristics with CMML. **Leuk Res.** v.65, p.1-4, 2018.

SEBAA, A.; ADES, L.; BARAN-MARZACK, F. Incidence of 17p deletions and TP53 mutation in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with 5q deletion. **Genes Chromosomes and Cancer**, v.51, p.1086–1092, 2012.

SEKERES, M.; A. The epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **Hematology/oncology Clinics of North America** v. 24, n. 2, p.287 294, 2010.

SELLERI, C.; MACIEJEWSKI, J.P.; CATALANO, L.; RICCI, P.; ANDRETTA, C.;LUCIANO, L.; ROTOLI, B. Effects of cyclosporine on hematopoietic and immune functions in patients with hypoplastic myelodysplasia: in vitro and in vivo studies. **Cancer.** v.95, n.9, p.1911-1922, 2002.

SEMENZA, G.L. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations. **J Clin Invest**, v.123, n.9, p.3664-71, 2013.

SERMEUS, A.; MICHIELS, C. Reciprocal influence of the p53 and the hypoxicpathways.**Cell Death Dis** v.2, p.e164, 2011.

SHAHRABI, S.; KHOSRAVI, A.; SHAHJAHANI, M.; RAHIM, F.; SAKI, N. Genetics and Epigenetics of Myelodysplastic Syndromes and Response to Drug Therapy: New Insights. **Oncol Rev.** v.10, n.2, p.3-11, 2016.

SIVASUBRAMANIAN, N.; COKER, M.L.; KURRELMMEYER, K.M.; MACLELLAN, W.R.; DEMAYO, F.J.; SPINALE, F.G.; MANN, D.L. Left ventricular remodeling in transgenic

mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor. *Circulation. Mol Med Rep.* v.17, n.1, p. 71–78, 2001.

STASI, R.; BRUNETTI, M.; BUSSA, S. Serum levels of tumour necrosis factor- α predict response to recombinant human erythropoietin in patients with myelodysplastic syndrome. *Clin Lab Haematol.*, v.19, p.197–201, 1997.

STEENSMA, D.; P. New challenges in evaluating anemia in older persons in the era of molecular testing. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* v. 2016, n.1, p.67-73, 2016.

STONE, J.; F.; SANDBERG, A.; A. Sex chromosome aneuploidy and aging. *Mutat Res.* v.338, n.1-6, p.107-13, 1995.

SUN, H.; MA, J.; SUN, L.; LIU, L. X.; ZHAO, L. M. Expressions of survivin, Bcl-2 and VEGF in patients with myelodysplastic syndrome and their relationship. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.*, v.14, n.2, p.271-275, 2006.

SWERDLOW, S. H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC Press.* v.2, n.4, 2008.

TEOFILI, L.; MARTINI, M.; NUZZOLO E. R. Endothelial progenitor cell dysfunction in myelodysplastic syndromes: possible contribution of a defective vascular niche to myelodysplasia. *Neoplasia*, v.17, p.401-409, 2015.

TONG, H.; HU, C.; ZHUANG, Z.; WANG, L.; JIN, J. Hypoxia-inducible factor-1 α expression indicates poor prognosis in myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*, v.53, n.12, p.2412-2418, 2012.

VACCA, A.; RIBATTI, D.; RONCALI, L; DAMMACCO, F. Leuk Lymphoma. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases. *Biological and clinical studies.* v.20, n.1, p.27-38, 1995.

VALENT, P.; HORNY, H. P.; BENNETT, J. M. Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. *Leuk Res.*, v.31, n.6, p.727-736, 2007.

VALENT, P. ICUS, IDUS, CHIP and CCUS: Diagnostic Criteria, Separation from MDS and Clinical Implications. *Pathobiology.* v.1, p.1-9, 2018.

VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; WESTERS, T. M.; WESTRA, A. H.; DRAGER, A. M.; VAN DER VELDEN, V. H.; OSSENKOPPELE, G. J. Identification of distinct prognostic subgroups in low and intermediate-1 risk myelodysplastic syndromes by flow cytometry. *Blood*, v.111, n.3, p.1067-1077, 2008.

VARDIMAN J. W. Hematopathological concepts and controversies in the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.*, v.2006, n.1, p.199-204, 2006.

VERCAUTEREN, S.; M.; STARCZYNOWSKI, D.T.; SUNG, S.; MCNEIL, K.; SALSKI, C.; JENSEN, C.;L.; BRUYERE, H.; LAM, W.;L.; KARSAN, A. T cells of patients with myelodysplastic syndrome are frequently derived from the malignant clone. **Br J Haematol.** v.156, n.3, p.409-12, 2012.

WANG, G. L.; SEMENZA, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. **J Biol Chem.**, v.270, p.1230–1237, 1995.

WARA, A.K.; CROCE, K.; FOO, S. BM-derived CMPs and GMPs represent highly functional proangiogenic cells: implications for ischemic cardiovascular disease. **Blood**, v.118, p.6461-6464, 2011.

WEINBERG, O. K.; HASSERJIAN, R. P. The current approach to the diagnosis of myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol.**, v.56, n.1, p.15-21, 2019.

WIMAZAL, F.; KRAUTH, M.T.; VALES, A.; BÖHM, A.; AGIS, H.; SONNECK, K.; AICHBERGER, K.J.; MAYERHOFER, M.; SIMONITSCH-KLUPP, I.; MÜLLAUER, L.; SPERR, W.R.; VALENT, P. Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes: correlation between VEGF expression and the FAB category. *Leuk Lymphoma.* v.47, n.3, p.451-60, 2006.

WOLACH, O.; STONE, R. Autoimmunity and Inflammation in Myelodysplastic Syndromes. **Acta Haematologica** v. 136, p.108-117, 2016.

YANG, L.; QIAN, Y.; EKSIÖGLU, E.; EPLING-BURNETTE, P.; K.; WEI, S. The inflammatory microenvironment in MDS. **Cell Mol Life Sci.** v.10, p.1959-66, 2015.

ANEXO A- PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA EXPRESSÃO DOS GENES HIF1-ALFA E VEGF E DE MARCADORES ANGIOGÊNICOS EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Pesquisador: Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);

Versão: 2

CAAE: 83921517.0.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/ PROPESQ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.699.561

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo de intervenção do tipo transversal, para fins de doutoramento, envolvendo seres humanos em que serão estudados marcadores de angiogênese e genes HIF-1 alfa e Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) em participantes com síndrome mielodisplásica.

Objetivo da Pesquisa:

Primário: Avaliar o impacto da expressão dos genes HIF1-alfa e VEGF sobre os níveis plasmáticos do biomarcador de angiogênese VEGF, em pacientes com síndrome mielo-displásica e leucemia mieloide aguda e sua correlação com o prognóstico.

Secundários:

- Analisar o perfil hematológico dos pacientes com LMA e SMD;
- Analisar o perfil cito morfológico dos pacientes;
- Avaliar a expressão dos genes HIF 1 alfa e VEGF dos participantes do estudo;
- Quantificar os níveis plasmáticos de VEGF
- Estratificar os pacientes com SMD quanto aos critérios do R-IPSS;
- Analisar a curva de sobrevivência dos pacientes em estudo
- Comparar a sobrevivência dos pacientes

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3366-8613 **Fax:** (85)3281-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.699.561

-Avaliar o papel prognóstico da expressão gênica do HIF1 alfa e VEGF nos pacientes

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Malores que o mínimo e segundo a pesquisadora relacionados com a coleta das amostras de sangue nos participantes.

Benefícios: Melhor conhecimento da doença, melhor estratificação de risco, melhor direcionamento terapêutico conforme descrito no protocolo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa factível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora os apresentou adequadamente.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo atendido ao que foi solicitado, o projeto se encontra adequado do ponto de vista ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

Apresentar relatório após o término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_985589.pdf	03/05/2018 12:41:04		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.doc	03/05/2018 12:29:27	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_angiogenese.docx	28/02/2018 11:16:54	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Orçamento	orcamento.docx	26/10/2017 10:30:40	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	autorizacao_orcamento.docx	26/10/2017 10:22:11	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto

UFC - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO WALTER
CANTÍDIO DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.699.561

Outros	declaracaolaboratorioFarmacia.docx	26/10/2017 10:20:17	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	declaracaolaboratoriohematologia.docx	26/10/2017 10:14:45	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	cartaapreclacao.docx	26/10/2017 10:12:16	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	termoutilizacaodeddos.docx	26/10/2017 10:10:00	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	cartaanuenciHUWC.docx	26/10/2017 10:00:40	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	fidepositariopb.docx	26/10/2017 09:59:11	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Outros	declaracaoetorhematologia.docx	26/10/2017 09:57:53	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Declaração de Pesquisadores	declaracaoconcordanciapb.doc	26/10/2017 09:56:21	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto
Folha de Rosto	folhaderostopb.doc	26/10/2017 09:49:43	Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 07 de Junho de 2018

Assinado por:
Maria de Fatima de Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo CEP: 60.430-370
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85) 3366-6613 Fax: (85) 3281-4961 E-mail: reclama@ufscar.br

APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa intitulado “IMPACTO DA EXPRESSÃO DOS GENES HIF1-ALFA E VEGF E DO BIOMARCADOR DE ANGIOGÊNESE VEGF NO PROGNÓSTICO DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA”, que tem por objetivo investigar fatores importantes que ajudarão a compreender melhor algumas doenças da medula óssea, a “fábrica” que produz o sangue. Essas alterações podem levar à anemia, diminuição das células de defesa e das plaquetas.

Através da coleta de uma amostra de sangue da medula serão realizados testes que possibilitarão avaliar alguns fatores que podem auxiliar no diagnóstico, na evolução da doença e no tratamento do paciente. A coleta será realizada pelo médico hematologista responsável pela coleta do mielograma, já agendada, que ocorrerá em ambiente hospitalar, não havendo a necessidade de marcar uma coleta exclusiva para o estudo. Será coletado um volume de 4 mL de sangue em um tubo adequado. Os riscos relacionados à coleta para a pesquisa serão os mesmos do mielograma, já que o local da punção será o mesmo, e incluem desconforto e/ou dor temporários no local da punção. Caso o (a) senhor (a) sinta algum desconforto após o procedimento, a equipe de hematologia estará disponível no setor para dar o suporte necessário.

O benefício que poderá ser obtido através desta pesquisa é a descoberta de alterações relacionadas à doença, ainda não estudadas, que fornecerão dados importantes para o desenvolvimento de melhores condutas no tratamento e no acompanhamento do paciente. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as dos outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente, sendo mantido o sigilo e a segurança dos dados obtidos. A qualquer momento o (a) senhor (a) poderá ter acesso aos resultados e benefícios encontrados na pesquisa. Não há despesas pessoais em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Não há também retribuição financeira relacionada à sua participação.

O senhor (a) tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na instituição. Em qualquer etapa do estudo, o (a) senhor (a) terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

A principal investigadora é a doutoranda **Talyta Ellen de Jesus dos Santos Sousa**. O (a) senhor (a) pode entrar em contato no telefone (85) 3366-8264 ou pelo email: ellenj_08@yahoo.com.br. “Se o (a) senhor (a) tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br”

Caso o (a) senhor (a) se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se concordar em participar, solicitamos que assine no espaço abaixo.

Assinatura do paciente/representante

Data ____/____/____

Assinatura de quem obteve o termo

Data ____/____/____

APÊNDICE B- ARTIGOS PRODUZIDOS EM COLABORAÇÃO RELACIONADOS À TESE

in vivo 33: 277-280 (2019)
doi:10.21873/invivo.11472

Presence of CD34⁺ in Megakaryocytes in Association With p53 Expression Predicts Unfavorable Prognosis in Low-risk Myelodysplastic Syndrome Patients

FERNANDO BARROSO DUARTE¹, TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS²,
MARITZA CAVALCANTE BARBOSA², ANNA THAWANNY GADELHA MOURA²,
JOÃO PAULO LEITÃO DE VASCONCELOS³, FRANCISCO DÁRIO ROCHA-FILHO⁴,
DIEGO F. COUTINHO⁵, ILANA ZALCBERG⁵, PAULO R.L. VASCONCELOS¹,
YHASMINE DELLES OLIVERIRA GARCIA² and ROMÉLIA PINHEIRO GONÇALVES LEMES²

¹Department of Surgery, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil;

²Research Laboratory in Hemoglobinopathies and Genetics of Hematologic Diseases, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil;

³University Hospital Walter Cantúdio, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil;

⁴Department of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil;

⁵National Institute of Cancer, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract. *Background/Aim:* Although risk stratification using the Prognostic Scores Systems (IPSS, WPSS and IPSS-R) incorporate key information about prognosis of patients with Myelodysplastic syndromes (MDS), patients classified as low-risk may evolve rapidly and aggressively, despite a "favorable" prognostic stratification. The aim of this study was to identify biomarkers for predicting prognosis, and for better stratification and management of these patients. *Materials and Methods:* Expression of CD34 and p53 in megakaryocytes was examined by immunohistochemistry in 71 MDS patients classified as low-risk. *Results:* CD34 staining in megakaryocytes was associated with p53 expression ($p=0.0166$). CD34 and p53 expression were associated to worse overall survival in patients ($p=0.0281$). *Conclusion:* The presence of CD34 in megakaryocytes is associated with p53 expression and an adverse prognosis for MDS patients.

Myelodysplastic Syndrome (MDS) comprises a group of clonal diseases of hematological progenitor cells, being

characterized by ineffective hematopoiesis and risk of progression to acute leukemia (1). Risk Stratification Prognostic Scores Systems (IPSS, WPSS and IPSS-R) normally determine the prognosis of patients and are essential for adequate clinical management. Although these systems have advanced in the characterization of patients by refining the used criteria, providing better stratification capacity (2), a subgroup of patients classified as low-risk shows a rapid and aggressive disease evolution, demonstrating the need to identify auxiliary markers for risk and prognostic stratification systems and recognize these individuals at an early stage and to provide them with adequate treatment (3).

The presence of megakaryocytes positive for CD34 has been reported as an unfavorable prognostic factor in hematological malignancies. In MDS patients, the clinical impact of the expression of CD34 in megakaryocytes is still discussed (4).

Mutations in TP53 gene are found in approximately 10-12% of MDS patients and are associated with worse prognosis and lower survival in patients with high-risk MDS. The expression of p53 protein by immunohistochemistry is an available method to predict the presence of these mutations (5, 6).

This study evaluated the role of CD34 expression in

Bone marrow fibrosis at diagnosis is associated with TP53 overexpression and adverse prognosis in low-risk myelodysplastic syndrome

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of stem cell clonal alterations, culminating in a high risk of progression to acute myeloid leukaemia (AML) (Greenberg *et al*, 2012). The prognosis of these patients is commonly determined by the International Prognostic Score System (IPSS), which considers the number of cytopenias, cytogenetic alterations and number of blasts in the bone marrow at diagnosis.

Patients with a lower risk of progression to AML are classified as low risk; however, a subgroup of these patients develops a disease with an aggressive course and a lower survival rate (Mittelman *et al*, 2010). This clinical heterogeneity reinforces the need to identify auxiliary markers for prognostic stratification systems.

Bone marrow fibrosis is a histological finding in approximately 10–20% of patients with *de novo* MDS; however, MDS with fibrosis is not yet recognized as a distinct entity and its prognostic role is still under debate (Ramos *et al*, 2016).

The immunohistochemical expression of TP53 has been used as a predictive marker for mutations in the TP53 gene in several haematological diseases due to the low-cost and easy to perform technique (Kulasekararaj *et al*, 2013). Moreover, studies have demonstrated that TP53 expression is an independent adverse prognostic factor in patients with high-risk MDS, being associated with complex karyotype and therapy-related MDS (Kulasekararaj *et al*, 2013).

Therefore, the present study investigated the impact of bone marrow fibrosis and TP53 expression at diagnosis on the clinical characteristics and overall survival of patients with low-risk MDS.

Seventy-three low-risk MDS patients treated at a reference University Hospital in the northeast of Brazil participated in the study. Patients were stratified according to the

3,3'-Diaminobenzidine (DAB; Dako), and counterstaining with haematoxylin. The percentage and intensity of TP53 staining was assessed based on a total manual count of 1000 granulocytic precursors. TP53 expression was defined as positive for a strong nuclear staining pattern, according to the Modified Quick Score (Kulasekararaj *et al*, 2013) in at least 1% of the cells analysed (Safi *et al*, 2014).

Patients were stratified for the presence of bone marrow fibrosis at diagnosis according to the criteria used by the European Myelofibrosis Network (Thiele *et al*, 2005). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Ceará (protocol #129/12) and all patients agreed to participate. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), using chi-square and Student's *t* or Mann-Whitney test, according data normality, verified by Kolmogorov-Smirnov test. The Kaplan-Meier curve was performed to verify differences in overall survival. Significance was set at $P < 0.05$.

The median age of the study patients was 65 years, with a predominance of females (64.3% females and 35.7% males). Most of the patients (49.32%) were classified as single-lineage dysplasia, followed by multi-lineage dysplasia (41.09%), MDS with ringed sideroblasts (6.85%) and MDS with isolated *del*(5q) (2.74%).

Patients with bone marrow fibrosis (MF-2 and MF-3) had significantly lower haemoglobin and haematocrit values at diagnosis when compared to patients without fibrosis (MF-0 and MF-1) ($P = 0.001$). High TP53 expression was associated with the presence of bone marrow fibrosis ($P = 0.008$). There was no difference between the other analysed parameters (Table 1).

Patients with bone marrow fibrosis [$P = 0.0007$, hazard ratio (HR) = 0.02, 95% confidence interval (CI) = 0.002–

and haematocrit values, suggesting a higher need for transfusion in this group, as described for patients with MDS, irrespective of risk stratification (Della Porta & Makcovi, 2011).

The association between the presence of bone marrow fibrosis and high TP53 expression supports the hypothesis that patients with medullary fibrosis at diagnosis may develop an unfavourable clinical course, as high TP53 expression has been frequently reported as an independent prognostic marker in this population (Bejar *et al.*, 2011; Kulasekararaj *et al.*, 2013).

These results corroborate the findings of Loghavi *et al.* (2015), who reported a 61.2% rate of high TP53 expression in patients with MDS and fibrosis. Similarly, Ramos *et al.* (2016) showed an association between bone marrow fibrosis and TP53 protein accumulation. It is possible that there is a biological interaction between mutations in the TP53 gene and bone marrow fibrosis; however, these mechanisms have yet to be elucidated.

Patients with bone marrow fibrosis and high TP53 expression had lower overall survival, indicating that, for low-risk patients, these markers may constitute independent prognostic factors that are capable of differentiating subgroups with different evolution potential within the same risk stratification. Interestingly, in the group with bone marrow fibrosis, TP53 expression did not have a cumulative effect on overall and AML-free survival. This finding may have been influenced by the small number and short follow-up of patients with bone marrow fibrosis.


The results obtained in the present study indicate the importance of using bone marrow fibrosis and TP53 expression analysis in patients with low-risk MDS as auxiliary

markers, aiming at attaining a higher predictive power and appropriate therapeutic management.


Author contributions

FBD and JPV designed the research study; FBD and RPGL performed the research; IZ, FDR and DFC contributed essential reagents or tools; MCB and TEJS analysed the data; MCB, TEJS, FBD and RPGL wrote the paper; PRLV critically revised the manuscript.

Fernando B. Duarte¹

Maritza C. Barbosa² 

Talyta E. Jesus dos Santos²

Romélia P. G. Lemes² 

João P. Vasconcelos³

Paulo R. L. de Vasconcelos⁴

Francisco D. Rocha⁴

Ilana Zalcberg⁵

Diego F. Coutinho⁵

¹Department of Surgery, University Hospital Walter Cantídio, Federal University of Ceará, ²Research Laboratory in Haemoglobinopathies and Genetics of Haematological Diseases, Federal University of Ceará, ³Hematology Service of Walter Cantídio University Hospital, ⁴Department of Surgery, Federal University of Ceará, Fortaleza, and ⁵Cellular Therapy Center of Porto Alegre, Center for Experimental Research, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

E-mail: maritza.cavalcante@hotmail.com

Keywords: myelodysplastic syndrome, TP53, myelofibrosis, prognosis

References

- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R.L., Neuberg, D. & Ebert, D.L. (2013) TP53 mutations in myelodysplastic syndromes. *Nature Reviews Cancer*, **13**, 637–646.
- Kulasekararaj, A.G., Smith, A.E., Mian, S.A., Mohamedali, A.M., Krishnamurthy, P., Lea, N.C., Gökten, J., Pennaneer, C., Ireland, R., Czepulkowski, B., Pomplun, S., Marsh, J.C. & Mufson, G.J. (2013) TP53 mutations in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Investigation*, **123**, 1037–1046.
- Tormo, M., Salido, E., Zamora, L., Pedro, C., Sánchez-del-Réal, J., Díez-Campelo, M., Cahn, C., Sanz, G.F. & Hernández-Rivas, J.M. (2016) Bone marrow fibrosis in myelodysplastic syndromes: a prospective evaluation including

APÊNDICE B- ARTIGOS PRODUZIDOS EM COLABORAÇÃO RELACIONADOS À TESE

Duarte et al. *Journal of Medical Case Reports* (2017) 11:143
DOI 10.1186/s13256-017-1301-8

Journal of
Medical Case Reports

CASE REPORT

Open Access



Presence of new mutations in the *TP53* gene in patients with low-risk myelodysplastic syndrome: two case reports

Fernando Barroso Duarte¹, Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes², Talyta Ellen de Jesus dos Santos^{2*}, Maritza Cavalcante Barbosa², João Paulo Leitão de Vasconcelos¹, Francisco Dário Rocha-Filho¹, Ilana Zalcberg³, Diego Coutinho³, Monalisa Feliciano Figueiredo², Luciana Barros Carlos⁴ and Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos¹

Abstract

Background: Myelodysplastic syndromes are heterogeneous disorders. Patients with myelodysplastic syndrome disease often have ineffective hematopoiesis, cytopenias, blood cell dysplasia in one or more cell types, and are at high risk for developing acute myeloid leukemia. In myelodysplastic syndrome, mutations of *TP53* gene are usually associated with complex karyotype and confer a worse prognosis. In the present study, two mutations in this gene are presented and discussed with the clinical evolution of the patients.

Case presentation: The first case is a 77-year-old Brazilian woman diagnosed as having multiple lineage dysplasia myelodysplastic syndrome according to World Health Organization 2016 and classified as very low-risk by Revised International Prognostic Scoring. The second case is an 80-year-old Brazilian man also diagnosed as having multiple lineage dysplasia myelodysplastic syndrome and classified as low risk. The mutation described in the first case was already identified in some neoplasias and it is associated with a poor prognosis, but it had never been reported before in myelodysplastic syndrome. The second mutation has never been described.

Conclusions: This is a novel report for the scientific community and may be very helpful as we can better understand the disease and the impact of mutations through the follow-up of these patients and others in the future. Both patients are in a good clinical condition, suggesting that these mutations may not alter the clinical course of the disease or may be associated with a good prognosis, but their role in the disease must be investigated more deeply in a larger population.

Keywords: Myelodysplastic syndromes, *TP53* mutations, Prognosis

Background

Myelodysplastic syndromes (MDS) are heterogeneous disorders. The *TP53* gene is implicated in the manifestation of hematologic features, specifically macrocytic anemia, frequently involved in MDS. Mutations in the *TP53* gene are usually associated with complex karyotype and confer a worse prognosis. Somatic mutations in the *TP53* tumor suppressor gene are found in approximately 50% of all human tumors, making it the most commonly mutated gene. The expression of p53 protein

and the study of mutations are important tools, mainly for the prognosis of MDS [1].

Although the biological and clinical roles that a normal and altered p53 protein play in cancer remain areas of intense investigation and debate, a number of studies have shown that alterations in p53 are either associated or not with patient outcomes, such as response to therapy or survival [2].

In this context, we present two case reports of very low-risk and low-risk MDS, according to the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R), with two *TP53* gene mutations described for the first time in patients with MDS and we describe the outcomes of these patients.

* Correspondence: talytaellen08@hotmail.com

²Research Laboratory in Hematopathies and Genetics of Hematologic Diseases, Federal University of Ceará, Capitão Francisco Pedro street, n. 1790, Redenção, Fortaleza, Ceará, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.